Göttingen 1960

Zur Synthese des Actinomycins C_3

Chromophorfreie Peptide als Modellsubstanzen und Actinocinylpeptide

von

SIGMUND VON GRUNELIUS

Zur Synthese des Actinomycins C_3

Chromophorfreie Peptide als Modellsubstanzen und Actinocinylpeptide

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch - Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von
Sigmund von Grunelius
aus
Frankfurt am Main

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Göttingen 1960

D7

Referent: Prof. Dr. H. Brockmann
Korreferent: Prof. Dr. H.G. Schlegel
Tag der mündlichen Prüfung: 26. Februar 1960

Fotodruck: Mikrokopie G.m.b.H. München 2, Weinstr. 4

Diese Dissertation habe ich im Organisch-Chemischen Institut der Universität Göttingen in der Zeit von Oktober 1957 bis Juli 1959 unter der Leitung von Herrn Professor Dr. H.Brockmann angefertigt.

Meinem verehrten Lehrer,
Herrn Professor Dr. H. Brockmann
danke ich, daß er mich mit dieser
Aufgabe betraut, bei ihrer Ausführung
beraten und mit Forschungsmitteln
großzügig unterstützt hat.

Der Dr. Karl Merck - Stiftung, Darmstadt
bin ich für ein großzügiges Stipendium
während der Dauer der Doktorarbeit
zu großem Dank verpflichtet.

Inhaltsverzeichnis

	Seite	
Theoretischer Teil		
A. Einleitung	1	
B. Die Synthese eines racemischen Pentapeptids: Seryl-L-prolyl-alanyl-leucyl-glycin	2 - 13	
I. Syntheseweg (a)	3	(41)
II. Syntheseweg (b)	6	(44)
III. Freisetzung des Seryl-prolyl-alanyl-leucyl-glycins aus seinem Carbobenzoxy-pentapeptid-methylester	7	(44)
IV. Analytische Untersuchungen der Pentapeptidsalze		
1. Papierchromatographie	9	
2. Potentiometrische Titration	9	(46)
3. Bestimmung des Gesamtstickstoffs nach Kjeldahl und des endständigen Amino-stickstoffs nach van Slyke im Pentapeptid-Präparat	12	(46)
V. Diskussion der Ergebnisse	13	
C. Die Synthese der Actinocinylpeptide	13 - 30	
I. L-Threonyl-D-allo-isoleucin-methylester	14	(47)
II. Die Synthese des Actinocinyl-bis-(L-threonyl-D-allo-isoleucins)		
1. N-(3-Nitro-3-hydroxy-4-methyl-benzoyl)-L-threonyl-D-allo-isoleucin-methylester	16	(50)
2. Actinocinyl-bis-(L-threonyl-D-allo-isoleucin-methylester)	18	(50)
3. Actinocinyl-bis-(L-threonyl-D-allo-isoleucin)	19	(51)
III. Die Synthese des Actinocinyl-bis-(L-threonyl-D-allo-isoleucyl-L-prolins)	21	
1. Actinocinyl-bis-(L-threonyl-D-allo-isoleucyl-L-prolin-methylester)	21	(53)
2. Actinocinyl-bis-(L-threonyl-D-allo-isoleucyl-L-prolin)	23	(54)

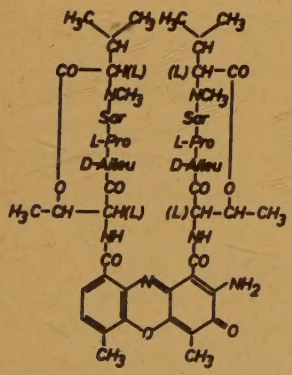
	Seite	
3. Actinocinyl-bis-(L-threonyl-D-allo-isoleucyl-L-prolin-benzylester)	25	(55)
IV. Charakteristik der Actinocinylpeptide im Überblick	27	
D. Versuche zur Bildung von Actinocinyl-O-peptiden	31-40	(57-60)
I. Die "Phosgenmethode"	33	(59)
II. Die Kupplung mit N,N'-Carbonyl-diimidazol	36	(60)
III. Kupplung nach Schotten - Baumann	37	(60)
E. Zusammenfassung der Ergebnisse	40	
Beschreibung der Versuche (Seitenzahlen in Klammern)	41-61	
Literaturverzeichnis	62	

THEORETISCHER TEIL

A. Einleitung

Seit 1946 wurden am hiesigen Institut Actinomycin-Gemische aus Actinomyceten isoliert und in mehrere, sich nur in den Peptidketten unterscheidende Komponenten zerlegt, deren Konstitution durch systematische Abbauversuche weitgehend aufgeklärt wurde. Über die bis 1954 erschienenen Veröffentlichungen gab H. Brockmann einen ersten allgemeinen Überblick [1]. 1956 wurde eine vorläufige Mitteilung [2] über Konstitution und Synthese des Actinomycin-Chromophors veröffentlicht, der 1958 eine ausführliche [3] folgte. Gleichzeitig schlug H. Brockmann 1956 für das am besten untersuchte Actinomycin C_3 [4] Formel I vor, die kürzlich - bis auf die Frage, ob die beiden Lactonringe "über's Kreuz" geschlossen sind oder nicht (wie in I) - streng bewiesen werden konnte [5].

Seit 1957 sind in unserem Institut Versuche zur Synthese von Actinocinylpeptiden +) im Gange. Ihr Ziel ist : 1) Actinocinylpeptide zu gewinnen, die als Zwischenprodukte bei der Totalsynthese der Actinomycine verwendet werden können und 2) solche Actinocinylpeptide aufzubauen, die als Abbauprodukte bei der Partialhydrolyse von Actinomycinen zu erwarten sind.

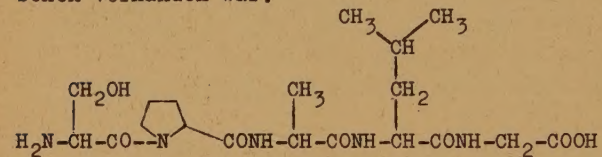


(I)

Dies war auch die Aufgabe der vorliegenden Dissertation. Die offenkettigen, optisch aktiven Actinocinylpeptide sollten möglichst auf mehreren Wegen und mit verschiedenen Methoden dargestellt werden, um eine optimale Ausbeute zu erreichen und eine Kontrolle für die spezifische Drehung zu haben. Außerdem waren Methoden zu untersuchen, die zu einem Lacton-Ringschluß zwischen Threonin und N-Methylvalin, bzw. der jeweils kettenendständigen Aminosäure führen könnten.

+) "Actinocinyl" bezeichnet den Acylrest der "Actinocin" oder "Actinomycin-Chromophor" genannten 3-Amino-1,8-dimethyl-phenoxazon-(2)-dicarbonsäure-(4,5).

Um mit den teuren optisch aktiven Aminosäuren sparsam und nutzbringend umzugehen, erschien es günstig, die nötigen Erfahrungen zuerst bei der Synthese eines racemischen, chromophorfreien Pentapeptids zu sammeln. Da dieses Pentapeptid die Voraussetzungen für einen Lacton-Ringschluß bieten sollte, mußte es dem Pentapeptid des Actinomycins C_3 ähnlich sein. Unter Berücksichtigung der verfügbaren Aminosäuren versuchte ich zunächst die Synthese des Seryl-L-prolyl-alanyl-leucyl-glycins durchzuführen: Serin besitzt wie Threonin eine alkoholische Hydroxygruppe; L-Prolin +), welches möglicherweise für die Konstellation der Peptidkette von Bedeutung ist, nimmt die 2. anstatt wie in I die 3. Stelle der Aminosäurekette ein, weil das Tripeptid Alanyl-leucyl-glycin (7 g) schon vorhanden war.



Seryl - prolyl-alanyl - leucyl - glycin

B. Die Synthese eines racemischen Pentapeptids:
Seryl-L-prolyl-alanyl-leucyl-glycin

Für den Aufbau des Carbobenzoxy-pentapeptid-methylesters (VII) boten sich zwei Möglichkeiten:

a. die Verknüpfung von Carbobenzoxy-seryl-prolin (V) mit Alanyl-leucyl-glycin-methylester (entspr. VI) oder

b. Die Kupplung von Carbobenzoxy-serin (II) mit Prolyl-alanyl-leucyl-glycin-methylester (entspr. IX), einem Tetrapeptidester, der sich seinerseits aus Carbobenzoxy-prolin und VI unter nachfolgender hydrogenolytischer Abspaltung des Carbobenzoxyrestes darstellen läßt.

Der Carbobenzoxy-Rest als leicht und quantitativ wieder abspaltbarer Schutz der Aminogruppe wurde deshalb gewählt, weil die von R. Schwyzer u. Mitarb.[6] beschriebenen "gefärbten" Carbobenzoxy-Gruppen zu Beginn der Dissertation noch nicht bekannt waren. Das zu seiner Einführung erforderliche Carbobenzoxychlorid (Chlorkohlensäure-benzylester) war nach A.C. Farthing [7] aus Benzylalkohol und Phosgen in quantitativer Ausbeute erhältlich.

+) Für "L-Prolin" steht im folgenden nur "Prolin", da die optische Aktivität in diesen Fällen ohne Bedeutung ist.

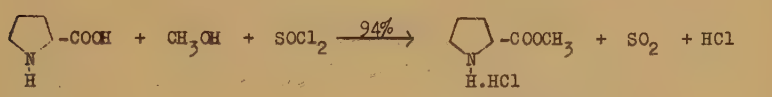
Für die Verknüpfung der einzelnen Peptidteile schien die Methode des "Gemischten Anhydrids" unter Verwendung von Chlorkohlensäure-äthylester nach allgemeinen Vorschriften von J.R. Vaughan jr. u. Mitarb.[8] aussichtsreich.

I. Syntheseweg (a)

Übersicht 1

1. $C_6H_5CH_2O\text{-}COCl + H_2N\text{-}CH(COOH)\text{-}CH_2OH \xrightarrow[77,5\%]{NaOH} C_6H_5CH_2O\text{-}CONH\text{-}CH(COOH)\text{-}CH_2OH$

Cbo-Cl+) Serin N-Cbo-Serin (II)

2. 

Prolin HCl.Pro-OCH_3 (III)

3. II + $N(n\text{-Butyl})_3 \longrightarrow$ Cbo-NH-CH(CH_2OH)-$COO^{\ominus}$ $^{\oplus}NH(n\text{-Butyl})_3$ $\xrightarrow{Cl\text{-}COOC_2H_5}$

$HCl.N(n\text{-Butyl})_3$ + Cbo-NH-CH(CH_2OH)-CO-O-CO-OC_2H_5 $\xrightarrow[74\%]{III + N(n\text{-Butyl})_3}$

"Gemischtes Anhydrid"

$CO_2 + C_2H_5OH + HCl.N(n\text{-Butyl})_3$ + Cbo-NH-CH(CH_2OH)-CO-N(Pro-$COOCH_3$)

Cbo-Ser-Pro-OCH_3 (IV)

$\xrightarrow[12\text{-}33\%]{NaOH}$ Cbo-Ser-Pro (V) $\xrightarrow{HBr/Eisessig}$ HBr.Ser-Pro

4. V + HCl.Ala-Leu-Gly-OCH_3 (VI) $\xrightarrow[55\ \%]{gem.\ Anhydr.}$

Cbo-Ser-Pro-Ala-Leu-Gly-OCH_3 (VII)

+) Der Carbobenzoxy-Rest wird mit "Cbo-" abgekürzt.

Zu 1. N-Carbobenzoxy-serin (II) gewann ich nach M. Bergmann u. L. Zervas[9] aus Cbo-chlorid und Serin in 2n NaOH bei 0° wie angegeben kristallin[+] (Schmp. 122-125°) in 40 proz. Ausbeute, wenn ich die Mischung mit einer elektrischen Rührmaschine kräftig rührte; bei Verwendung eines Vibro-Mischers stieg die Ausbeute unter sonst gleichen Bedingungen erstaunlicherweise auf 77,5 % d. Th.

Zu 2. Prolinmethylester-hydrochlorid (III) entstand in Anlehnung an die Vorschrift von M. Brenner u. W. Huber[10] aus Prolin, Methanol und Thionylchlorid kristallisiert in 94 proz. Ausbeute.

Zu 3. Für die Kondensation zum Cbo-seryl-prolin-methylester (IV) wurde aus äquimolaren Mengen von II, Tributylamin und Chlorkohlensäure-äthylester in Toluol bei - 5° bis - 10° das "Gemischte Anhydrid" gebildet[8], welches mit einer Lösung von III und Tributylamin (zur Bindung der Salzsäure in III) in Chloroform sofort in 74 proz. Ausbeute zu IV, einem gelbbraunen Öl, reagierte.

Dieser Ester (IV) wurde in 6 Ansätzen bei jeweils veränderten Bedingungen zu Cbo-seryl-prolin (V) alkalisch verseift, jedoch lag die Ausbeute in Durchschnitt nur bei 27 %. Die unverseiften Anteile ließen sich z.T. zurückgewinnen und erneut einsetzen.

Die Variation bei den einzelnen Ansätzen betraf:

a. das Medium. Zur Aufrechterhaltung einer homogenen Lösung kam 2n NaOH in Aceton oder Methanol oder einer Mischung von beiden zur Anwendung. Bei einem Versuch wurde die Lösung von IV in Äther mit 2n NaOH mechanisch geschüttelt.

b. den Überschuß an 2n NaOH. Die Natronlauge wurde in äquivalenter bis doppelter Menge eingesetzt.

c. die Reaktionsdauer. Sie betrug 1 bis 9 Stunden.

d. die Temperatur. Sie lag zwischen 20° und 50°.

Bei einem Teil von V spaltete ich den Cbo-Rest mit 30 proz. Bromwasserstoffsäure in Eisessig[11] ab, wodurch sich ein unerwünschter Ringschluß zum Diketopiperazin vermeiden ließ.

$$C_6H_5CH_2O\text{-}CONH\text{-}R + 2\ HBr \xrightarrow{\text{Eisessig}} C_6H_5CH_2Br + CO_2 + HBr.H_2N\text{-}R$$

Das entstandene Serylprolin-hydrobromid zeigte im Ringpapierchromatogramm im System n-Butanol/Eisessig/Wasser - (4:1:5) neben

+) Sämtliche Schmpp. wurden im Berl-Block bestimmt und sind korrigiert.

der ninhydrin-positiven Zone der Dipeptids eine Verunreinigung an Serin. Da Serylprolin nahezu denselben R_f-Wert wie Prolin hatte, schnitt ich zur genauen Identifizierung - wie auf S. 43 näher beschrieben - die noch nicht mit Ninhydrin entwickelte Zone des Dipeptids aus, eluierte mit n/10 HCl und hydrolysierte mit 12n HCl. Nun waren Serin und Prolin im Ringpapierchromatogramm zu erkennen.

Da die Ausbeute nur 19 % d. Th. betrug und Benzylbromid nicht restlos zu entfernen war, würde sich diese Methode kaum zur präparativen Darstellung eignen. Die - in diesem Falle nicht ausgeführte - Abspaltung der Cbo-Gruppe mit Wasserstoff und Palladium-Tierkohle in Gegenwart einer äquivalenten Menge Salzsäure zur Bildung des Hydrochlorids (vgl. S. 6) schlösse die Diketopiperazinbildung bei quantitativer Ausbeute an Serylprolin wahrscheinlich ebenso aus.

Zu 4. Die Methode der Veresterung mit Methanol und Thionylchlorid[10] ließ sich auch zur Bereitung von Alanyl-leucyl-glycinmethylester-hydrochlorid (VI) aus Alanyl-leucyl-glycin heranziehen. VI fiel als glasig-amorphes Produkt in fast quantitativer Ausbeute an.

Der letzte Schritt, die Verknüpfung von V und VI zum Cbo-pentapeptid-ester (VII) geschah wieder über die Stufe des "Gemischten Anhydrids". Die Ausbeute an VII, einem gelbbraunen Öl, lag bei 2 Ansätzen um 55 %, jedoch entstand jeweils beim Beginn des Ausschüttelns der VII enthaltenden organischen Phase mit Wasser ein emulgierender Niederschlag eines offenbar polymeren Peptids, welches die Aufarbeitung sehr erschwerte. Da dieses Nebenprodukt - ein weißes, nur in heißem Eisessig lösliches und beim Verdünnen mit Wasser in Flocken ausfällbares Pulver - aber nicht mehr als 5 % der Estermenge ausmachte, waren nur einzelne Untersuchungen (Löslichkeit, Schmp., Elementaranalyse, Ringpapierchromatographie des Totalhydrolysats) möglich, die indess kein eindeutiges Bild ergaben; immerhin schien das Produkt viel Prolin und kein Serin zu enthalten.

II. Syntheseweg (b)

Übersicht 2

$$\text{Cbo-Pro} + \text{HCl.Ala-Leu-Gly-OCH}_3 \text{ (VI)} \xrightarrow[81\ \%]{\text{gem. Anhydr.}}$$

$$\text{Cbo-Pro-Ala-Leu-Gly-OCH}_3 \text{ (VIII)} \xrightarrow[99,6\ \%]{\text{H}_2\text{-Pd/C + HCl}}$$

$$\text{HCl.Pro-Ala-Leu-Gly-OCH}_3 \text{ (IX)} \xrightarrow[\text{gem. Anhydr. } 35\ \%]{\text{N-Cbo-Ser (II)}}$$

$$\text{Cbo-Ser-Pro-Ala-Leu-Gly-OCH}_3 \text{ (VII)}$$

Diesen 2. Weg wählte ich, um die ungünstige Verseifung von IV zu umgehen.

Cbo-L-prolin erhielt ich nach W. Grassmann u. E. Wünsch[12] in 90 proz. Ausbeute aus Cbo-chlorid und L-Prolin.

Die Kupplung von Cbo-prolin mit Alanyl-leucyl-glycin-methylester-hydrochlorid (VI) zum Cbo-prolyl-alanyl-leucyl-glycin-methylester (VIII), einem glasigen, amorphen Körper, gelang über das "Gemischte Anhydrid" in 81 proz. Ausbeute.

Die Abspaltung des Cbo-Restes erfolgte mit katalytisch (Pd/C) erregtem Wasserstoff in Methanol in Gegenwart e i n e s Äquivalents Salzsäure zur Vermeidung eines möglichen Ringschlusses. Die Ausbeute an IX, einem spröden Glas, war quantitativ:

$$\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2\text{O-CONH-R} + \text{H}_2 + \text{HCl} \xrightarrow{\text{Pd/C}} \text{HCl}\cdot\text{H}_2\text{N-R} + \text{CO}_2 + \text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_3$$

Die Kondensation von Carbobenzoxy-serin (II) mit Prolyl-alanyl-leucyl-glycin-methylester-hydrochlorid (IX) lieferte den Cbo-seryl-prolyl-alanyl-leucyl-glycin-methylester (VII), jedoch nur in 35 proz. Ausbeute.

Obgleich die Ausbeute bei der letzten Synthese-Stufe unbefriedigend blieb, war der Syntheseweg (b) vorteilhafter, schon weil kein stark emulgierendes Polypeptid auftrat.

III. Freisetzung des Seryl-prolyl-alanyl-leucyl-glycins aus seinem Carbobenzoxy-pentapeptid-methylester (VII)+)

Da sich beim Cbo-seryl-prolin-methylester (IV) gezeigt hatte, daß die Verseifung von Cbo-peptidestern Schwierigkeiten machen kann und aus unserem Mitarbeiterkreis ähnliche Erfahrungen vorlagen, befreite ich VII zuerst mit katalytisch erregtem Wasserstoff von seiner Cbo-Schutzgruppe und verseifte den Methylester anschließend mit Barytwasser. Diese Art der Verseifung, die ich auf zwei Weisen vorzunehmen versuchte, schien anfangs günstiger, weil sich überschüssiges Barium als Sulfat oder Carbonat abtrennen läßt.

Ansatz 1. Die hydrogenolytische Abspaltung der Cbo-Gruppe erfolgte unter Zusatz eines Äquivalents Salzsäure und führte zum teilweise kristallisierten Pentapeptidester-hydrochlorid (94 % d.Th.), den ich mit 2,5 Äquivalenten Barytwasser - 1 Äquivalent Barytwasser zur Neutralisation der gebundenen Salzsäure - verseifte. Als ich danach mit n H_2SO_4 auf pH 7 einstellte, fiel nur die Hälfte des Bariums als Sulfat aus, während sich das zurückbleibende Bariumchlorid nach dem Eindampfen des Filtrats durch Herauslösen des Peptids mit abs. Äthanol nur unvollständig abtrennen ließ. Das freie Pentapeptid war ein amorphes, in Wasser und Alkohol leichtlösliches Pulver, dessen Elementaranalyse jedoch nicht befriedigte, da die Substanz noch 27,5 % unverbrennbaren Rückstand enthielt. Deshalb fällte ich das gesamte Barium mit einem geringen Überschuß an n H_2SO_4 aus. Das Pentapeptid lag jetzt aber nicht mehr frei, sondern als Hydrochlorid bzw. Sulfat vor.

Ansatz 2. Die hydrogenolytische Abspaltung der Cbo-Gruppe erfolgte o h n e Zugabe von Salzsäure. Der Pentapeptidester fiel in 93 proz. Ausbeute als farbloses Öl an, welches sich weder trübte, noch gelatinierte oder kristallisierte, woraus geschlossen wurde, daß sich Cyclopeptide oder polymere Peptide nicht gebildet hatten.

Diesen Pentapeptidester verseifte ich mit 1,25 Äquivalenten Barytwasser und fällte Barium durch Einleiten von Kohlendioxyd

+) Hierzu diente das auf dem Syntheseweg (a) dargestellte Produkt.

und anschließendes Erhitzen der Lösung als Bariumcarbonat. Aber auch diesmal bestand das Präparat zu 24 % aus anorganischem Material.

Neben der Tatsache, daß die Löslichkeit des Bariumcarbonats doch nicht gering genug oder - anders ausgedrückt - die Wassermenge wegen des häufigen Filtrierens und Nachwaschens etwas zu groß war, mußte mit der Möglichkeit einer Bariumcarbaminat-Bildung+) gerechnet werden. Diese Verbindung ließ sich mit wenig n H_2SO_4 und n HCl++) in der Hitze zersetzen, eine Reaktion, die aber wiederum nur zum Pentapeptid-hydrochlorid bzw. -sulfat führte.

$$HOOC\text{————}NH_2 + CO_2 + \frac{Ba^{++}}{2} \dashrightarrow HOCC\text{————}NH\text{-}COO\frac{Ba}{2} + H^+$$

Zur Reindarstellung des Pentapeptids selbst bestand noch die Möglichkeit, den Methylester mit verd. Natronlauge zu verseifen, exakt mit verd. Salzsäure zu neutralisieren und das gebildete Natriumchlorid in einer elektrolytischen Entsalzungsapparatur nach T. Astrup[13] zu entfernen. Da aber weitere Reaktionen sowieso nur am carbobenzoxylierten Pentapeptid vorgenommen werden können, war die Darstellung von Seryl-prolyl-alanyl-leucyl-glycin in präparativem Maßstab garnicht erwünscht. Deshalb und wegen des komplizierten Aufbaus der Apparatur wurde von der Salzelektrolyse abgesehen.

Interessant schien es hingegen, das Pentapeptidsalz, auch wenn es nicht rein war, qualitativ und quantitativ näher zu untersuchen, schon um mit einigen analytischen Methoden vertraut zu werden.

+) Nach einer Privatmitteilung von K.W. Ohly soll überdies ein weiteres Äquivalent Barium hierbei komplex festgehalten werden.

++) Ich gab nur soviel Schwefelsäure zu, daß gerade alles Barium ausgefällt war. Ein auch nur mäßiger Überschuß würde die Bildung von Hydrogensulfaten begünstigen oder beim Einengen der Lösung sogar zersetzend wirken, während Salzsäure leichter entweicht.

IV. Analytische Untersuchung der Pentapeptidsalze

1. Papierchromatographie

Das Totalhydrolysat des Pentapeptids zeigte im Ringchromatogramm in den Systemen:
n-Butanol/Eisessig/Wasser - (4:1:5) und (2:1:1)+) sowie
n-Butanol/Eisessig/Wasser/Phenol - (5:1:5:5)
jeweils vier Zonen, die (Serin u. Glycin), Alanin, Prolin und Leucin enthielten. Um Serin und Glycin wenigstens teilweise voneinander zu trennen, entwickelte ich später im System: Phenol/3 proz. wäßr. Ammoniak (eine geringe Menge Kaliumcyanid enthaltend). In diesem System lagen Prolin und Leucin in der gleichen Zone. Prolin ließ sich durch Besprühen der Zone mit Isatinlösung nachweisen, Leucin in der üblichen Weise mit Ninhydrin.

Die Entdeckung der Pentapeptid-Zone bereitete anfangs Schwierigkeiten, da sie nach der Behandlung mit Ninhydrin ähnlich wie die Zone des Seryl-prolins oder des zum Vergleich herangezogenen Glycyl-leucyl-glycyl-alanyl-phenylalanins nur schwach gelb gefärbt war und erst 1-2 Tage später rötlich und somit besser sichtbar wurde. Im System Phenol/3 proz. wäßr. Ammoniak wanderte das Pentapeptid nahe der Lösungsmittelfront in einer verwaschenen ninhydrinpositiven Zone. Im System n-Butanol/Eisessig/Wasser - (4:1:5) tauchten zwei schmale und eine breite Zone auf:
Zone I (kleinster R_F-Wert) enthielt eine geringe Menge Serin;
Zone II wurde - analog Seryl-prolin (S.43) - ausgeschnitten, eluiert und totalhydrolysiert. Im Ringchromatogramm waren Serin und Prolin sichtbar. Zone II bestand also aus Serylprolin, dessen Auftreten aus dem Gang der Synthese (Syntheseweg a) verständlich war. Das Totalhydrolysat der eluierten Hauptzone III schließlich enthielt Serin, Prolin, Alanin, Leucin und Glycin, Zone III enthielt demnach das Pentapeptid Seryl-prolyl-alanyl-leucyl-glycin.

2. Potentiometrische Titration

Zur Charakterisierung meines Pentapeptid-Präparates wurde es nach W. Sunderkötter[14] potentiometrisch in einer Mischung von

---

+) Die Mengenangabe versteht sich für Phenol in g, für alle übrigen Lösungsmittel in ccm.

Methanol p.a./35 proz. Formalinlösung p.a./Wasser - (9:2:1) bzw. Methanol/Wasser - (3:1)[+] titriert, wobei zum Vergleich verschiedene Modellsubstanzen mit titriert wurden, deren Molekulargewicht sich mit einer Genauigkeit von ± 1-3 % bestimmen ließ.

Bei Serin- und Prolin-hydrochlorid (Abbild. 1) waren bei Zugabe von Formalin jeweils 2 Äquivalenzpunkte erkennbar, denen entsprechende Halbstufenpotentiale[++] - in wäßr. Lösung pK-Werte - zugeordnet werden können. $ÄP_1$ entspricht dem Carboxylat-Anion, $ÄP_2$ der Aminogruppe:

$$H_3N^{\oplus}\text{———}COOH \overset{-H^{\oplus}}{\rightleftharpoons} \underset{ÄP_1}{H_3N^{\oplus}\text{———}COO^{\ominus}} \overset{-H^{\oplus}}{\rightleftharpoons} \underset{ÄP_2}{H_2N\text{———}COO^{\ominus}}$$

Bei Alanyl-leucyl-glycin (Abbild. 3) und Glycyl-leucyl-glycyl-alanyl-phenylalanin (Abbild. 2) traten jeweils nach Verbrauch des 1. u. 2. Äquivalents methanolischer Natronlauge die Äquivalenzpunkte $ÄP_1$ und $ÄP_2$ auch o h n e Formalin ebenso deutlich hervor, weil die Ammoniumkationen der beiden Peptidhydrochloride schon von Natur aus saurer sind als die der einfachen Aminosäuren. Das hat aber andererseits zur Folge, daß die Ammoniumkationen m i t Formalin die Acidität der Carboxygruppen erreichen und somit beide Äquivalenzpunkte nach dem Zutropfen von 2 Äquivalenten Natronlauge zusammenfallen (Abbild. 3).

Abbild. 5 zeigt die Titrationskurve des Pentapeptid-hydrochlorids bzw. -sulfats[+++] (2. Ansatz, S. 7):

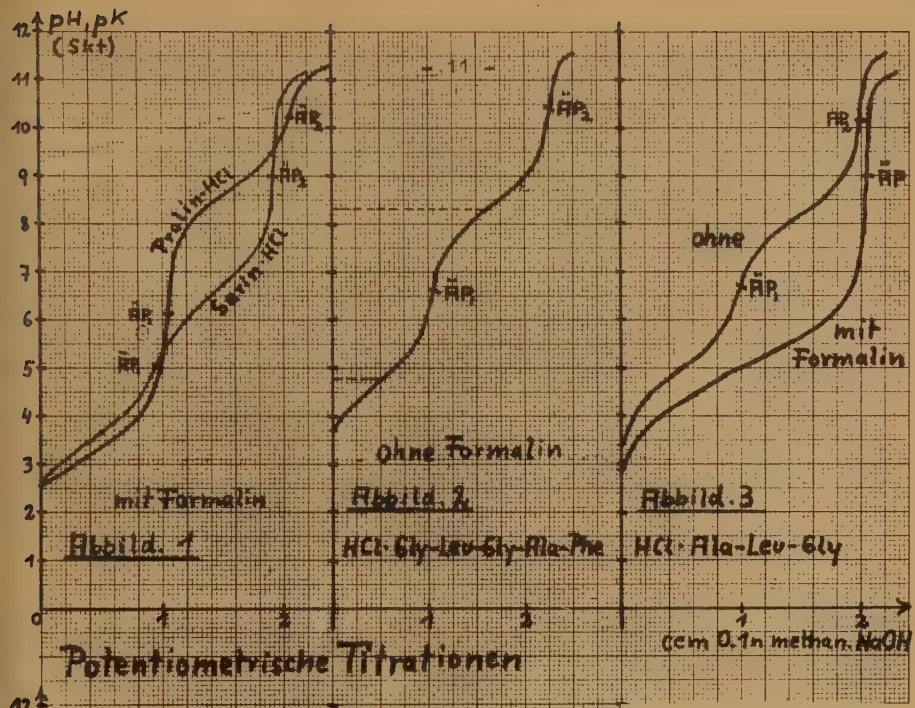
a. $ÄP_1$ entspricht der zurücktitrierten, überschüssigen Salzsäure, die sich bei der Darstellung des Präparats durch Eindampfen nicht restlos entfernen ließ.

b. $ÄP_2$ muß der gleichzeitig titrierten Carboxygruppe und dem Ammoniumkation zugeordnet werden.

+) Die Zusammensetzung der Mischungen beruht auf einer Privatmitteilung von W. Sunderkötter und stellt eine Verbesserung der in seiner Diplomarbeit angeführten Lösungsgemische dar.

++) Das Potential wird in Skalenteilen angegeben, die nur in grober Näherung mit den in rein wäßr. Medium gültigen pH- u. pK-Einheiten vergleichbar sind.

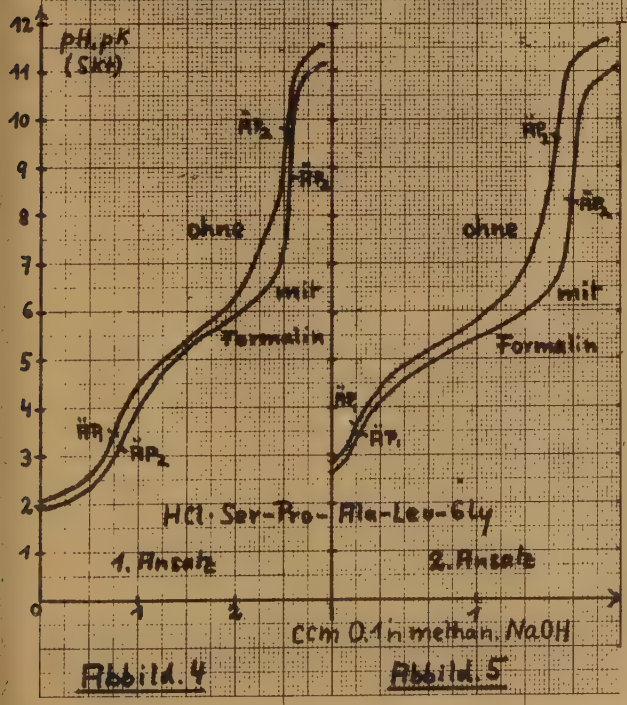
+++) Da eine Mischung beider vorlag, konnte das Mol-Gew. zwar nicht genau in Rechnung gezogen werden, der Fehler ist aber unerheblich:
Mol des Hydrochlorids = 479,9; Mol des Sulfats = 492,4.



Abbild. 1 — Abbild. 2 — Abbild. 3

HCl·Gly-Leu-Gly-Ala-Phe — HCl·Ala-Leu-Gly

Potentiometrische Titrationen



Abbild. 4 — Abbild. 5

c. Die Zugabe von Formalin blieb ohne entscheidenden Einfluß, jedoch kann man den deutlich steileren Anstieg der Kurve in Abwesenheit von Formalin als T e n d e n z zu einem 2. Wendepunkt auslegen.

d. Der Natronlaugeverbrauch zwischen $ÄP_1$ und $ÄP_2$ beträgt im Mittel 1,46 Äquivalente, woraus auf eine 73 proz. Reinheit des Präparats zu schließen wäre. Abbild. 4 zeigt als einzigen Unterschied den Verbrauch von ca 1,80 Äquivalenten Natronlauge an. Das Präparat des 1. Ansatzes (S. 7) wäre demnach zu 90 % rein.

3. Bestimmung des Gesamtstickstoffs nach Kjeldahl und des Aminostickstoffs nach van Slyke im Pentapeptid-Präparat

Für beide Analysen verwendete ich aliquote Mengen einer wäßr. Maßlösung des reineren Pentapeptid-Präparats (1), so daß unabhängig von anorganischen Verunreinigungen und in der Substanz eingeschlossenem Lösungsmittel das Verhältnis Gesamtstickstoff/endst. Aminostickstoff stets 5:1 sein sollte.

Die Bestimmung nach Kjeldahl, ergab in Parallelversuchen 11,66 % und 11,73 % Gesamtstickstoff (bez. auf Mol-Gew. 479,9), während 14,6 % N berechnet war. Dieserbeträchtliche Unterschied ist z.T. auf eingeschlossenes Lösungsmittel zurückzuführen, das sich auch beim Erhitzen auf 50° i. Hochvak. nie ganz entfernen ließ.

Die Bestimmung nach van Slyke führte ich nach Angaben von W. Otting[15] und in der dafür vorgesehenen Apparatur aus. Gemessen wurde der nach

$$R\text{-}NH_2(.HCl)+NaNO_2+CH_3COOH \longrightarrow R\text{-}OH+N_2+CH_3COONa+H_2O\ (+HCl)$$

entstandene Stickstoff mit einer Genauigkeit von ± 2 %.

Nach mehreren Vergleichsbestimmungen an Glycin, Glycin-hydrochlorid und Wasser (Blindwert) fand ich in Parallelversuchen 1,05 % und 1,07 % Aminostickstoff (bez. auf Mol-Gew. 479,9); berechnet wurden 2,92 % N.

Der Quotient Gesamtstickstoff/endst. Aminostickstoff beträgt also im Mittel 11,70:1,06 = 11:1 anstatt 5:1. Dieses Verhältnis würde auf eine Minderzahl an Ammoniumgruppen hindeuten, jedoch ist es mit dem Ergebnis der potentiometrischen Titration nicht in Einklang zu bringen.

V. Diskussion der Ergebnisse

Die Darstellung des Cbo-pentapeptid-methylesters (VII) hatte sich als relativ einfach erwiesen und auch seine papierchromatographisch geprüfte Reinheit war durchaus befriedigend. Die Tatsache, daß die Cbo-peptide oder Peptid-methylester niemals kristallin und meist auch nur ölig waren, führte auf Grund der Unmöglichkeit selbst i. Hochvak. das Lösungsmittel vollständig zu entfernen, bei der Elementaranalyse zu erheblich niedrigeren Stickstoffwerten. Dieser Nachteil ließ damals die Möglichkeit einer chromatographischen Reinigung sehr vermissen. Heute stehen hierfür "gefärbte" Cbo-Gruppen[6] oder auch die im nächsten Abschnitt zu besprechende 2-Nitro-3-hydroxy-4-methyl-benzoesäure (XIV) zur Verfügung, die sich jedoch nicht wieder partiell abspalten läßt.

Die Reindarstellung des freien Pentapeptids war nicht geglückt. Ohne Zweifel ließe sich der hohe Prozentsatz an anorganischen Beimengungen durch Umsatz größerer Mengen, die aber nicht zur Verfügung standen, wesentlich verringern. Es bleibt aber immer noch die Schwierigkeit und vor allem die Unübersichtlichkeit der Esterverseifung bei abgespaltener Cbo-Gruppe. Rückblickend ist es doch wohl besser, die Cbo- anstatt freien Pentapeptidester zu verseifen, wobei die übersichtliche Reaktion eine evtl. geringere Ausbeute aufwöge, da sich unverseiftes Ausgangsprodukt erneut einsetzen läßt.

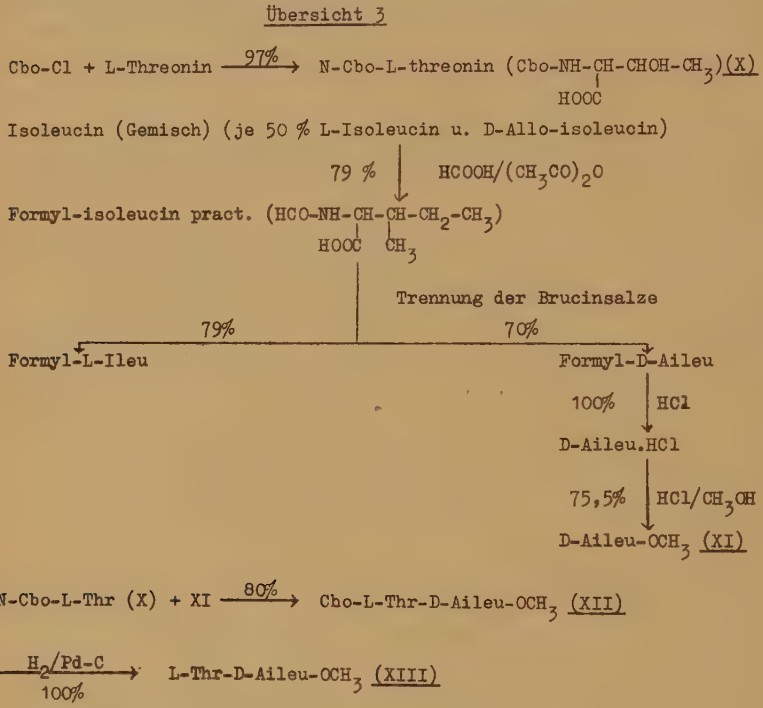
C. Die Synthese der Actinocinylpeptide

Als Zwischenprodukte zur Synthese von Actinomycin C_3 (I) waren im Frühjahr 1958 Actinocinyl-bis-L-threoninmethylester[16] und racemisches Actinocinyl-bis-(threonyl-isoleucin)[17] schon bekannt. Daraufhin wurde als nächstes die Synthese des Actinocinyl-bis-(L-threonyl-D-allo-isoleucyl-L-prolins) (XVIIc) geplant, die gleichzeitig die noch unbekannten und als Modellsubstanzen wichtigen Zwischenstufen Actinocinyl-bis-(L-threonyl-D-allo-isoleucin) (XVIa) bzw. dessen Methylester (XVI) liefern sollte. Diese Synthese war die Hauptaufgabe der vorliegenden Arbeit und soll nun näher erörtert werden.

Als Ausgangssubstanzen standen L-Threonin, Isoleucin-Gemisch, L-Prolin und 2-Nitro-3-hydroxy-4-methyl-benzoesäure (XIV) zur Verfügung. Den 1. Schritt, die Synthese des Dipeptidesters (XIII) möge Übersicht 3 veranschaulichen.

I. L-Threonyl-D-allo-isoleucin-methylester (XIII)

Übersicht 3



Zu 1. Carbobenzoxy-L-threonin (X) erhielt ich nach den für Serin geltenden Angaben[9] aus Cbo-chlorid und L-Threonin in 2n NaOH unter Eiskühlung auch bei Verwendung eines "Vibro-Mischers" in nur 35 proz. Ausbeute. Kleine Variationen zur Konstanthaltung des pH 9 verbesserten den Umsatz nicht.

Dagegen erhielt ich nach einer neueren Vorschrift[18], die Natriumhydrogencarbonat-Lösung als Medium empfiehlt, beim Rühren mit dem Vibro-Mischer bei 25° Cbo-L-threonin (X) in 97 proz. Ausb.,

was die in der Literatur vermerkte Menge bei weitem übertraf. X kristallisierte erst nach mehreren Monaten.

Zu 2. Um das käufliche Isoleucin-Gemisch mit Brucin in D-allo-Isoleucin und L-Isoleucin aufzuspalten, wurde es zunächst nach den für Valin gültigen Angaben[19] mit Ameisensäure/Acetanhydrid formyliert.

Die Zerlegung des so erhaltenen Formyl-Derivates mit Brucin in die Komponenten Formyl-L-isoleucin und Formyl-D-allo-isoleucin erfolgte analog der Vorschrift für Formyl-DL-valin[20], wobei einige Verbesserungen von U. Bahr[21] besonders zustatten kamen.

Die Formylgruppe des Formyl-D-allo-isoleucins spaltete ich hydrolytisch mit Salzsäure in der Siedehitze wieder ab und veresterte das auf diese Weise gewonnene D-allo-Isoleucin-hydrochlorid durch Kochen der mit Chlorwasserstoffgas gesättigten methanolischen Lösung zum D-allo-Isoleucin-methylester-Hydrochlorid. Den freien, flüssigen D-allo-Isoleucin-methylester (XI) (Sdp.$_{12}$ 74°) erhielt ich nach dem Verfahren von Brenner u. Huber[10] durch Neutralisation des Hydrochlorids mit konz. Ammoniak unter Äther; er war gut verschlossen ca 5 Monate im Eisschrank haltbar. Eine kleine Probe wurde in Äther mit Chlorwasserstoffgas in das reine kristalline Hydrochlorid überführt, das bei 122° schmolz.

Zu 3. Zur Darstellung des Cbo-L-threonyl-D-allo-isoleucin-methylesters (XII) nach der "mixed-anhydrid"-Methode erwiesen sich Erfahrungen bei der Synthese des rac. Pentapeptids als nützlich. Jedoch durfte für die Verknüpfung opt. aktiver Aminosäuren anstatt Chloroform nur Tetrahydrofuran (oder Dioxan) als Lösungsmittel Verwendung finden[22], um eine partielle Racemisierung zu unterbinden. Bei drei Ansätzen variierte ich die Reaktionszeit für die Bildung des "Gemischten Anhydrids" aus X und Chlorkohlensäure-äthylester v o r Zugabe der Esterkomponente (XI) zwischen 5 u. 60 Min. und die Reaktionstemperatur zwischen -15° u. -5°. Im günstigsten Falle - 5 Min. bei -15° - überstieg jedoch die Ausbeute an kristallisiertem XII 32 % nicht.

Eine wesentlich bessere Ausbeute brachte die Verwendung von N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid (C_6H_{11}-N=C=N-C_6H_{11}) nach Sheehan[23], welches bei der Kupplung zweier Aminosäurekomponenten zum Cbo-dipeptid-ester unter Wasseraufnahme in N,N'-Dicyclohexyl-harnstoff (C_6H_{11}-NH-CO-NH-C_6H_{11}) übergeht. Die Reaktion - ausgeführt in

Methylenchlorid oder einer Mischung mit Tetrahydrofuran - verlief so glatt, daß sie bei weiteren Peptidsynthesen infrage kam.

Mitentscheidend für die Verwendung von Dicyclohexyl-carbodiimid war eine neue, sehr günstige Darstellungsmethode[24] bei der man Cyclohexylamin und Harnstoff zum Dicyclohexyl-harnstoff umsetzt und aus diesem mit Tosylchlorid Wasser abspaltet. Da sich ebenderselbe Dicyclohexyl-harnstoff auch bei Peptidsynthesen fast quantitativ aus dem Reaktionsgemisch abschied, konnte er immer wieder zum Dicyclohexyl-carbodiimid regeneriert werden.

Die Dicyclohexyl-carbodiimid-Methode lieferte auf die Kupplung von Cbo-L-threonin (X) mit D-allo-Isoleucin-methylester (XI) angewandt die Verbindung XII in 80 proz. Ausb.[+] und war bequemer als das "mixed-anhydrid"-Verfahren. Die spez. Drehungen der auf beiden Wegen erhaltenen Cbo-L-threonyl-D-allo-isoleucin-methylester-Präparate deckten sich innerhalb der Fehlergrenze. Der von U. Bahr[21] angegebene Schmp. (88-90°) für sein unter Einsatz von Chlorkohlensäure-äthylester gewonnenes Präparat fand sich bestätigt.

Die zum freien L-Threonyl-D-allo-isoleucin-methylester (XIII) führende Abspaltung der Cbo-Gruppe erfolgte mit katalytisch erregtem Wasserstoff in Methanol. Nach den Erfahrungen bei der Synthese des rac. Pentapeptids durfte ein Zusatz von Salzsäure unterbleiben. Der als farbloser Sirup anfallende Ester (XIII) war im Vakuumexsikkator haltbar.

II. Die Synthese des Actinocinyl-bis-(L-threonyl-D-allo-isoleucins) (XVIa) (s.Übersicht 4, S. 17)

1. N-(2-Nitro-3-hydroxy-4-methyl-benzoyl)-L-threonyl-D-allo-isoleucin-methylester (XV)

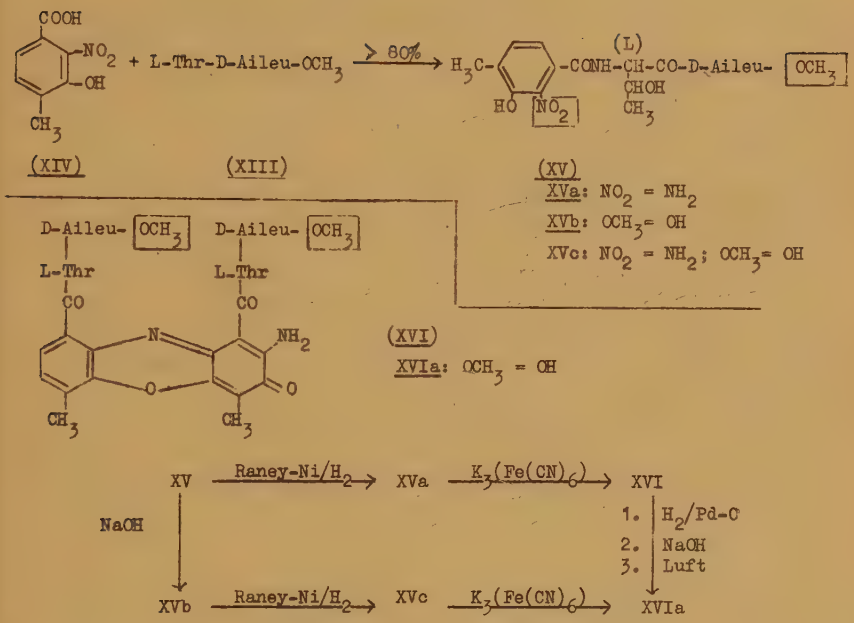
Mit N,N'-Dicyclohexyl-carbodiimid als Kondensationsmittel setzte ich äquimolare Mengen XIV und L-Threonyl-D-allo-isoleucin-methylester (XIII) in Tetrahydrofuran[++]/Methylenchlorid zu

---

+) Ein Vorrat von 23 g ist noch vorhanden.

++) Tetrahydrofuran war als Lösungsmittel für XIV, XVIa und bei späteren Versuchen unbedingt erforderlich. Um es frei von Peroxyden zu erhalten, wurde es nach M. Pestemer (25) gereinigt und vor jedem Gebrauch nochmals über Natrium destilliert.

Übersicht 4



N-(2-Nitro-3-hydroxy-4-methyl-benzoyl)-L-threonyl-D-allo-isoleucin-methylester (XV) um. Dabei war es wichtig, XIII und das Dicyclohexyl-carbodiimid gleichzeitig zur Lösung von XIV in Methylenchlorid unter Kühlung zuzugeben. Die sofort eingetretene Rotfärbung der Mischung, die auch die Farbe des amorphglasigen Rohprodukts (XV) bestimmte, mag wohl auf der Bildung von Anlagerungsverbindungen unter Beteiligung des Dicyclonexyl-carbodiimids beruhen.

Die Reinigung von XV erfolgte an einer Säule aus saurem, aktivierten, mit Chloroform eingeschlämmten Kieselgel[26] durch Nachwaschen mit Chloroform/Aceton - (4:1), sowie an Cellulosesäulen in den Systemen n-Butanol/n-Dibutyläther/10 proz. wäßr. Natrium-m-kresotinat - (2:3:5) und tert. Amylalkohol/n-Dibutyläther/10 proz. wäßr. Natrium-m-kresotinat - (1:2:3). Besonders das zweite System gestattete eine scharfe Trennung in mehrere gelbe und purpurne, langsam wandernde Nebenzonen und eine gelbe schnell laufende Hauptzone, deren Eluat nach der üblichen Nachreinigung

auf Aluminiumoxyd (Merck, standard. n. H. Brockmann) überraschenderweise einen r o t e n Lack lieferte, dessen Analysenwerte nicht befriedigten.

Da das Reaktionsprodukt seiner Konstitution nach nicht rot[+)] sein konnte, wurde die Reinigung mit "chemischen" Mitteln fortgesetzt Dabei nützte ich die Löslichkeit von XV in Natriumcarbonatlösung[+)] aus. Mit Essigester ließen sich der alkalischen Lösung alle roten Verunreinigungen entziehen und nach Ansäuern und Aufarbeiten der hellgelben, wäßr. Phase erhielt ich ein aus Essigester/Cyclohexan vorzüglich in feinen Nadeln vom Schmp. 115° kristallisierendes Präparat mit exakten Analysenwerten.

Im Wiederholungsfalle führte ich diese "chemische" vor der chromatographischen Reinigung aus. Die Essigesterextraktion der soda-alkalischen Lösung des Rohprodukts (XV) allein lieferte nur ein vorgereinigtes Präparat, dessen Feinreinigung sich besonders gut an neutralem[26)], aktivierten Kieselgel bewerkstelligen ließ. Bezogen auf die in äquimolarer Menge eingesetzten Ausgangsverbindungen betrug die Ausbeute 80 % der Theorie.

2. Actinocinyl-bis-(L-threonyl-D-allo-isoleucin-methylester) (XVI)

Für die oxydative Kondensation zu XVI verwendete ich das rohe, rote Produkt XV.

Die R e d u k t i o n seiner 2-Nitro- zur 2-Aminogruppe (XVa) geschah mit durch Raney-Nickel aktiviertem Wasserstoff in Methanol[++)]. Die Aufarbeitung - Absaugen des Katalysators und Eingengen der Lösung - wurde sehr schnell und möglichst unter Luftabschluß durchgeführt, um unerwünschte Oxydationsreaktionen zurückzudrängen, die bei der o-Aminophenol-Konstitution des Reaktionsproduktes sehr leicht eintreten.

Aus dem gleichen Grunde nahm ich die o x y d a t i v e Kondensation von XVa zu XVI ohne Isolierung von XVa vor. Als Oxydationsmittel[++)] wandte ich im allgemeinen 6 Äquivalente

---

+) Die Nachbarstellung von Hydroxy- u. Nitrogruppe ermöglicht eine orthochinoide, durch eine Wasserstoffbrücke begünstigte Tautomerie, Ursache des g e l b e n Chromophors und seiner s a u r e n Eigenschaften.

++) Katalytische Reduktion und oxydative Kondensation in der vorliegenden Form bauen im wesentlichen auf der Darstellungsmethode für Actinocinyl-bis-glycinmethylester (3) auf und haben seit einiger Zeit in unserem Mitarbeiterkreis allgemein Eingang gefunden.

Kalium-hexacyanoferrat-III an, entsprechend dem Entzug von 6 Atomen Wasserstoff aus 2 Molekülen XVa; jedoch genügten auch 4 Äquivalente, da sich das Phenoxazin- schon an der Luft zum Phenoxazon-System oxydierte.

$$6\ H + 6\ Fe^{3+} + 6\ OH^- \longrightarrow 6\ Fe^{++} + 6\ H_2O \qquad \text{bzw.}$$
$$6\ H + 4\ Fe^{3+} + 1/2\ O_2 + 4\ OH^- \longrightarrow 4\ Fe^{++} + 5\ H_2O$$

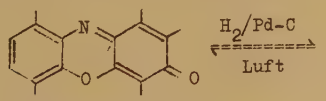
Durch den Verbrauch an Hydroxylionen werden Protonen frei, weshalb die Oxydation in einer Phosphatpufferlösung vom pH 7,4 ausgeführt wurde.

Nach dieser Methode fiel XVI als Rohprodukt in 95 proz. Ausbeute an. Die Prüfung im Ringpapierchromatogramm zeigte einen erheblichen Gehalt an Verunreinigungen an. Für die Papierchromatographie eigneten sich die nahezu gleichwertigen Systeme n-Butanol/n-Dibutyläther/10 proz. Natrium-m-kresotinatlösung - (2:3:5) und tert. Amylalkohol/n-Dibutyläther/10 proz. Natrium-m-kresotinatlösung - (1:2:3). Im präparativen Maßstab an der Cellulosesäule war die Trennung in beiden Systemen nicht vollkommen und werde deshalb an saurem Kieselgel in Chloroform vollendet.

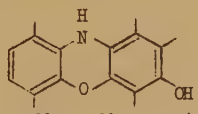
Der papierchromatographisch reine Actinocinyl-bis-(L-threonyl-D-allo-isoleucin-methylester) (XVI) war ein roter Lack, der sich aus Benzol/Cyclohexan in Form roter Flocken umfällen ließ. Eine Kristallisation des in 51 proz. Ausbeute erhaltenen, analysenreinen Präparats gelang trotz vieler Versuche nicht.

3. Actinocinyl-bis-(L-threonyl-D-allo-isoleucin) (XVIa)

Da das chinoide Phenoxazon-System von XVI alkaliempfindlich ist, mußte es, bevor XVI zum Actinocinyl-bis-(L-threonyl-D-allo-isoleucin) (XVIa) verseift wurde, reversibel in das benzoide System überführt werden.



rotes Phenoxazon-System



gelbes Phenoxazin-System

Um die 4-stündige Verseifung mit 5 Äquivalenten n/10 NaOH bei 40°, das Absaugen des Katalysators und auch noch die anschließende Neutralisation mit der äquivalenten Menge n HCl unter Wasser-

stoff auszuführen, benutzte ich eine Glasapparatur, die erstmals G. Troemel[16] beschrieben hat.

Ansatz a: Zur Verseifung verwendete ich den rohen Ester XVI, reinigte die Säure XVIa an einer Cellulosesäule im System Isoamylalkohol/$\frac{m}{15}$ Phosphatpuffer pH 6,0 - (1:1) und erhielt in 85 proz. Ausb. eine amorphe, papierchromatographisch reine, aus wäßr. Methanol nicht kristallisierende Substanz, deren Analysenwerte auf XVIa paßten und deren Totalhydrolyse Threonin und Isoleucin lieferte.

Nun bestand aber noch die Möglichkeit, die Verseifung der Methoxygruppen ohne die immerhin zeitraubende Hydrierung des Actinomycinchromophors vorzunehmen, derart, daß man schon XV, dessen gelber Chromophor alkalistabil ist, zur entsprechenden Säure (XVb) verseift und diese dann zu XVIa "dimerisiert".

Um unter möglichst milden Bedingungen zu arbeiten, verseifte ich rohes XV 45 Min. bei 20° mit 3 (Ansatz b) und 1,5 (Ansatz c) Äquivalenten Natronlauge. Nach anschließender katalytischer Reduktion der 2-Nitro- (XVb) zur 2-Aminogruppe (XVc), oxydativer Kondensation und chromatographischer Reinigung des Kondensationsproduktes erhielt ich aus Ansatz b ein amorphes Präparat XVIa in 50 proz., aus Ansatz c ein ebensolches in 34 proz. Ausbeute. Besonders im letzten Fall war die Verseifung unvollständig gewesen.

Beide Stoffe glichen in allen Eigenschaften (Sinterungsbeginn, Löslichkeit, R_F-Wert, Totalhydrolyse) und vor allem in den spez. Drehungen (α_D: ca -70°) genau dem aus Ansatz a gewonnenen Produkt.

Um diese 2. Methode womöglich noch hinsichtlich der Ausbeuten zu verbessern, nahm ich bei einem 4. Versuch (Ansatz d) einige Änderungen vor:

Als Ausgangssubstanz diente reines, krist. XV, das ich 105 Min. mit 2 Äquivalenten Natronlauge verseifte, wovon die acide, phenolische Hydroxygruppe 1 Äquivalent beanspruchte. Die Kontrolle durch Ringchromatogramm im System n-Butanol/n-Dibutyläther/10 proz. Natrium-m-kresotinatlösung - (2:3:5) und tert. Amylalkohol/n-Dibutyläther/10 proz. Natrium-m-kresotinatlösung -

(1:2:3) ergab nur eine, nicht wandernde Zone, und zeigte somit, daß die Veresterung quantitativ war+).

Das aus diesem Verseifungsprodukt nach Reduktion und oxydativer Kondensation erhaltene XVIa reinigte ich an einer Cellulosesäule im System Isoamylalkohol/$\frac{m}{15}$ Phosphatpuffer pH 6,6 - (1:1). Hierdurch erreichte ich eine sehr viel langsamere (2 Tage), aber feinere Trennung als bei pH 6,0, mit dem Ergebnis, daß XVIa nunmehr aus wäßr. Methanol in 64 proz. Ausbeute in Form roter Nadeln kristallisierte, die sich bei 222° zersetzten und deren Elementaranalyse gut mit den berechneten Werten übereinstimmte. Die Kristalle unterschieden sich im R_F-Wert und in der spez. Drehung nicht von den amorphen Präparaten (XVIa). Die amorphe Form ist also wohl durch einen geringen Gehalt an Verunreinigungen bedingt, die sich beim Umfällen nicht entfernen ließen. Wie sich aber später vielfach zeigte, war es für die Weiterverwendung gleichgültig, ob ich ein kristallines oder amorphes Ausgangsprodukt eingesetzt hatte.

III. Synthese des Actinocinyl-bis-(L-treonyl-D-allo-isoleucyl-L-prolins), s. Übersicht S. 22.

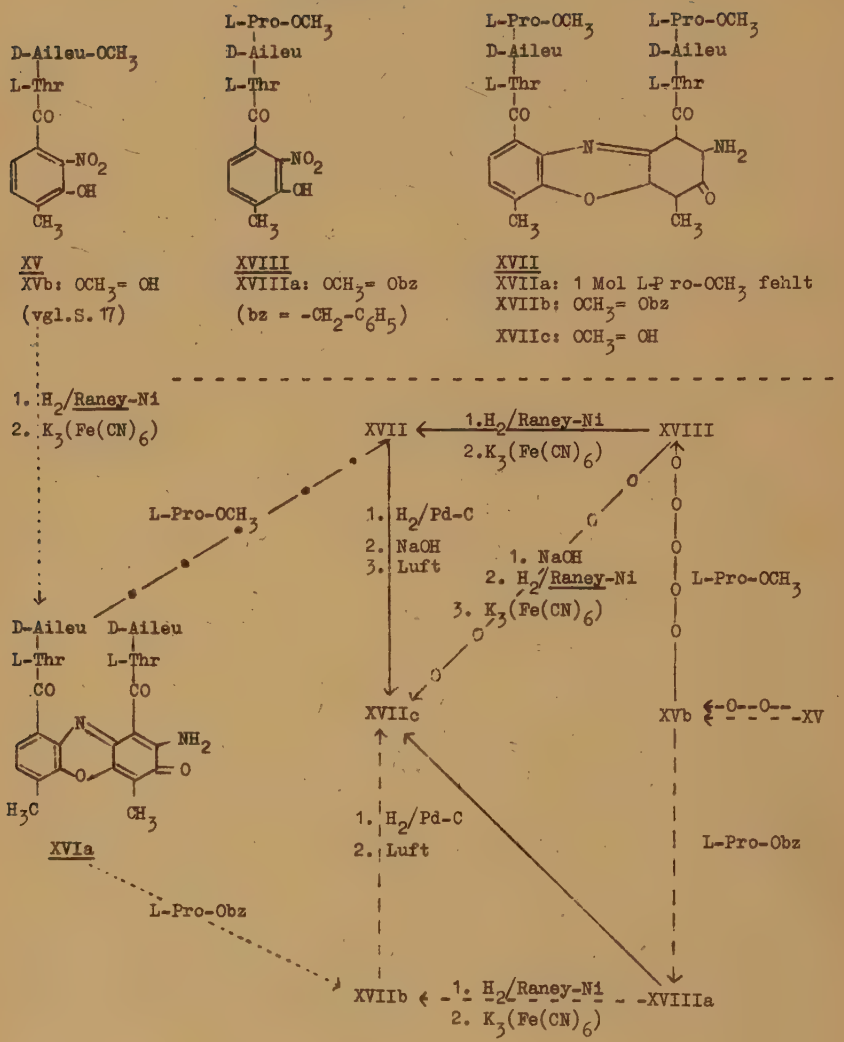
1. Actinocinyl-bis-(L-threonyl-D-allo-isoleucyl-L-prolin-methylester) (XVII)

Um den bisher dargestellten Actinocinyl-bis-dipeptiden als weitere, dritte Aminosäure gemäß der Sequenz im Actinomycin C_3 (I) L-Prolin anzugliedern, schien es am nächstliegenden Actinocinyl-bis- (L-threonyl-D-allo-isoleucin) (XVIa) mit L-Prolinmethylester zu verknüpfen, der als Hydrochlorid (III) zur Verfügung stand. Da III seiner stark hygroskopischen Eigenschaften wegen zu einem Sirup zerlaufen und somit sein Reingehalt unbekannt war, setzte ich daraus mit Ammoniak unter Äther[10] den L-Prolinmethylester frei, den ich durch Vak.-Destillation als farblose Flüssigkeit vom $Sdp._{13}$ 73,5° erhielt.

Als Kondensationsmittel für die Peptidsynthese (Übersicht 5: —•—•→) wählte ich wieder Dicyclohexyl-carbodiimid und gab

+) Die quantitative Verseifung von XV zu XVb und von XVI zu XVIa überraschte nach den weniger günstigen Erfahrungen der Verseifung des N-Cbo-seryl-prolinmethylesters (IV). Es liegen aber noch nicht genügend Beispiele vergleichbarer Verseifungen vor, um eine Erklärung für dieses unterschiedliche Verhalten zu geben.

Übersicht 5



⟶ (ausgezogene Linie) zeigt präparativ nicht ausgeführte Möglichkeiten an.

zu der Lösung von XVIa in Tetrahydrofuran/Methylenchlorid 4 statt 2 Äquivalente L-Prolinmethylester, um nach Möglichkeit die Bildung von Halbestern (XVIIa) auszuschließen. Bei der üblichen Aufarbeitung gewann ich durch Extraktion mit 0,4 n $NaHCO_3$ einen Teil der eingesetzten Säure XVIa zurück, jedoch wahrscheinlich verunreinigt mit XVIIa, einem der beiden möglichen Mono-Prolinmethylester Die organische Phase trennte sich an neutralem Kieselgel beim Nachwaschen mit Chloroform/Aceton in zwei rote Zonen auf. Der aus der schnelleren Zone eluierte Lack lieferte nach Umfällen aus Essigester/Cyclohexan rote Flocken in 16 proz. Ausbeute. Totalhydrolyse, Unlöslichkeit in 0,4 n $NaHCO_3$, Methoxyl- u. quant. Aminosäurebestimmung sprachen eindeutig für das Vorliegen von Actinocinyl-bis-(L-threonyl-D-allo-isoleucyl-L-prolinmethylester) (XVII).

Der Verdampfungsrückstand der langsameren Zone ließ sich nach Umfällen aus heißem Benzol/Cyclohexan durch Totalhydrolyse, Methoxyl- u. quant. Aminosäurebestimmung und seiner Löslichkeit in 0,4n $NaHCO_3$ als einer der beiden (oder ein Gemisch beider) Mono-L-prolinmethylester (XVIIa) identifizieren. Die Menge war noch etwas geringer als bei XVII.

In den Systemen:
n-Butanol/n-Dibutyläther/10 proz. wäßr. Natrium-m-kresotinat - (2:3:5) und tert. Amylalkohol/n-Dibutyläther/10 proz. wäßr. Natrium-m-kresotinat - (1:2:3) wanderten XVII und besonders XVIIa im Ringchromatogramm bedeutend langsamer als XVI. (vgl. Abbild. 7 u. 8, S. 28).

Die erhaltene Menge an XVII reichte für Vergleiche mit dem aus Abbauversuchen am Actinomycin C_3 erhaltenen Material vollauf aus, jedoch schien es unzweckmäßig das für weitere Synthesen in Aussicht genommene Actinocinyl-bis-(L-threonyl-D-allo-isoleucyl-L-prolin) (XVIIc) auf dem Wege der Verseifung des nur schwer zugänglichen XVII darzustellen. Deshalb machte ich von der im folgenden beschriebenen Möglichkeit Gebrauch.

2. Actinocinyl-bis-(L-threonyl-D-allo-isoleucyl-L-prolin) (XVIIc)

Die Darstellung des Actinocinyl-bis-(L-threonyl-D-allo-isoleucins) (XVIa) war am besten auf dem in Übersicht 4 (S. 17) angedeuteten Weg: XV → XVb → XVc → XVIa gelungen. Daher schlug

ich für die Synthese der Prolin enthaltenden Säure XVIIc den analogen Weg: XV → XVb → XVIII → XVIIc ein. (Übersicht 5: --O--O-→)

Ich verseifte krist. N-(2-Nitro-3-hydroxy-4-methyl-benzoyl)-L-threonyl-D-allo-isoleucin-methylester (XV) in gewohnter Weise und kuppelte die Säure XVb ohne weitere Reinigung unter Verwendung von Dicyclohexyl-carbodiimid in Methylenchlorid an den im Überschuß vorhandenen L-Prolinmethylester. Hierbei fiel auf, daß die Lösung gelb blieb im Gegensatz zur intensiven Rotfärbung bei der analogen Verknüpfung von XIII und XIV zu XV. Das Reaktionsprodukt, den rohen N-(2-Nitro-3-hydroxy-4-methyl-benzoyl)-L-threonyl-D-allo-isoleucyl-L-prolinmethylester (XVIII) trennte ich an neutralem Kieselgel in 2 gelbe Zonen auf. Das Eluat der Hauptzone hinterließ beim Verdampfen ein gelbes lackartiges Produkt, das aus Essigester auf Zusatz von Cyclohexan in 86 proz. Ausbeute als gelbes Pulver ausfiel. Es wurde durch Totalhydrolyse, Methoxyl-Bestimmung und seine Löslichkeit in Natriumcarbonat als XVIII identifiziert.

Seine Verseifung erfolgte wie bisher mit zwei Äquivalenten Natronlauge. Die dabei entstandene Säure wurde nicht isoliert, sondern sofort der katalytischen Hydrierung mit Raney-Nickel und der oxydativen Kondensation zum gewünschten Actinocinyl-bis-(L-threonyl-D-allo-isoleucyl-L-prolin) (XVIIc) unterworfen.

Die papierchromatographische Kontrolle des Rohprodukts (XVIIc) im System Isoamylalkohol/$\frac{m}{15}$ Phosphatpuffer pH 6,0 - (1:1) zeigte, daß XVIIc langsamer wanderte als XVIa (Abbild. 6, S.28); außerdem wies eine mit der Front laufende Zone auf die Anwesenheit eines Halbesters hin. Die Ausbeute an chromatographisch reinem, aus Benzol/Cyclohexan/Petroläther in roten Flocken gefällten XVIIc betrug 37 % d. Theorie. Sie ließe sich durch längere Verseifung von XVIII (120 statt 45 Min.), sowie durch Benzolextraktion der bei der Aufarbeitung angefallenen wäßr. Mutterlaugen - die Säure XVIIc ist, wie ich später feststellte, beträchtlich wasserlöslicher als XVIa - erheblich steigern. Kristallisationsversuche mit XVIIc blieben erfolglos.

Die Identität meines amorphen Reaktionsproduktes mit XVIIc sicherte ich durch quant. Aminosäurebestimmung und Elementaranalyse.

Unterzöge man XVIII anstatt zu verseifen direkt der katalytischen Hydrierung und oxydativen Kondensation so gelangte man

in sicherlich guter Ausbeute zu XVII und vermiede so den ungünstigen Weg über XVIa (vgl. Übersicht 5).

3. Actinocinyl-bis-(L-threonyl-D-allo-isoleucyl-L-prolin-benzylester) (XVIIb)

Im Hinblick auf die im Abschnitt D (S. 31) beschriebenen Versuche zur Darstellung von O-Peptiden, für die - wie im einzelnen zu zeigen sein wird - Actinocinylpeptide mit endständigen Carboxy- oder Carbomethoxy-gruppen als Ausgangsstoffe ungeeignet sind, versuchte ich nun nicht mehr XVII und XVIIc in besseren Ausbeuten zu erhalten, sondern wandte mich der Synthese des entsprechenden Benzylesters (XVIIb) zu.

Den hierfür nötigen L-Prolinbenzylester bereitete ich in Analogie zur Darstellung des D-allo-Isoleucin-methylesters (XI) aus L-Prolin und chlorwasserstoff-gesättigtem Benzylalkohol, wobei das bei der Reaktion gebildete Wasser mit Benzol wiederholt azeotrop abdestilliert wurde. Der L-Prolinbenzylester fiel in 90 proz. Ausbeute als krist. analysenreines Hydrochlorid an, welches bei der papierchromatographischen Prüfung im Aminosäuresystem Phenol/Eisessig/Butanol/Wasser - (18:5:40:40) nur noch geringste Spuren an Prolin aufwies.

a. Trotz den ungünstigen Ergebnissen bei der Anlagerung von Actinocinyl-bis-(L-threonyl-D-allo-isoleucin)(XVIa) an L-Prolinmethylester wollte ich diesen Weg doch noch einmal mit L-Prolinbenzylester-hydrochlorid versuchen. Gleichzeitig plante ich die Synthese von XVIIb zu einem "S c h n e l l v e r f a h r e n" unter Verzicht auf jegliche zeitraubende chromatographische Reinigung der Zwischenprodukte zu entwickeln. (S. 22, Übersicht 5: ·····→)

Hierzu verseifte ich N-(2-Nitro-3-hydroxy-4-methyl-benzoyl)-L-threonyl-D-allo-isoleucin-methylester (XV) als Rohprodukt 2 Stdn. mit zwei Äquivalenten Natronlauge, wobei auffiel, daß sich die - v o r Zugabe der Natronlauge - rote Lösung nach der Neutralisation mit Salzsäure nach dunkelgelb aufhellte. Die längere Verseifungsdauer hatte also offenbar zu einer Zerstörung der Nebenprodukte geführt.

Nach der üblichen Hydrierung von XVb zu XVc und der oxydativen Kondensation mit Kalium-hexacyanoferrat-III erhielt ich Actinocinyl-bis-(L-threonyl-D-allo-isoleucin) (XVIa) in 79 proz.

Ausbeute als amorphes Pulver, welches sich im System Isoamylalkohol/$\frac{m}{15}$ Phosphatpuffer pH 6,0 - (1:1) als papierchromatographisch nahezu rein erwies.

Da XV aber als Rohprodukt 20 % Nebenprodukte enthielt, läßt sich die 79 proz. Ausbeute an XVIa kaum anders erklären, als daß bei der gründlichen Verseifung von XV ein Teil der Nebenprodukte ebenfalls zu XVb reagiert hatte. XVIa setzte ich ohne weitere Reinigung in Tetrahydrofuran mit Dicyclohexyl-carbodiimid und L-Prolinbenzylester-hydrochlorid/Triäthylamin (10 % Überschuß) um. Nach dem üblichen Waschprozeß (n HCl; 0,4n $NaHCO_3$; Wasser) isolierte ich XVIIb in fast quantitativer Ausbeute. Seine chromatographische Prüfung zeigte, daß das Produkt fast rein war. Zur Weiterverwendung brauchte XVIIb, das ich mit Hilfe dieses "Schnellverfahrens" in 79 proz. Ausb. (bez. auf XIII u. XIV) gewonnen hatte, deshalb nicht weiter gereinigt zu werden.

Für analytische Untersuchungen jedoch reinigte ich einen Teil davon auf einer Säule aus neutralem, mit Chloroform eingeschlämmten Kieselgel. XVIIb kristallisierte nicht, seine Reinheit bestätigte ich durch Elementaranalyse und quant. Aminosäurebestimmung.

b. Gleichzeitig gewann ich den Benzylester XVIIb - ebenfalls in einem "S c h n e l l v e r f a h r e n" - auf dem anderen, in Übersicht 5 (- - - - →) aufgezeigten Weg: XV → XVb → XVIIIa → XVIIb. Hierdurch wollte ich insbesondere eine Kontrolle der spez. Drehung von XVIIb erhalten.

XV unterwarf ich als Reinprodukt einer 1 stünd. natronalkalischen Verseifung, deren Vollständigkeit ich papierchromatographisch bestätigt fand. Mit Hilfe von Dicyclohexyl-carbodiimid verknüpfte ich in Methylenchlorid die vom Natriumchlorid nicht befreite Säure XVa mit L-Prolinbenzylester-hydrochlorid/Triäthylamin. N-(2-Nitro-3-hydroxy-4-methyl-benzoyl)-L-threonyl-D-allo-isoleucyl-L-prolinbenzylester) (XVIIIa) erhielt ich als gelben Lack in quant. Ausb. und papierchromatographisch reiner Form.

Durch Raney-Nickel aktivierter Wasserstoff reduzierte die Nitrogruppe in XVIIIa selektiv zur 2-Aminoverbindung, ohne gleichzeitig die Benzylgruppe hydrogenolytisch abzuspalten. Es war lediglich darauf zu achten, daß der berechnete Wasserstoffverbrauch nicht überschritten wurde. Das Reaktionsprodukt der oxydativen

Kondensation war dem Papierchromatogramm nach zur Hauptsache XVIIb. Die Ausbeute betrug 87 % d.Th. (bez. auf XV).

Zur analytischen Untersuchung reinigte ich wiederum einen Teil an neutralem Kieselgel. Die Elementaranalyse und die Übereinstimmung der spez. Drehungen der Verbindungen aus beiden Ansätzen waren gut.

An Hand eines Versuches in sehr kleinem Maßstab konnte ich zeigen, daß die Hydrierung des Benzylesters XVIIb mit Palladium-Kohle unter nachfolgender Reoxydation des Chromophors an der Luft quantitativ zur Säure XVIIc führt, welche auf diesem Weg am leichtesten zugänglich wäre.

IV. Charakteristik der Actinocinylpeptide im Überblick

Um in den vorhergegangenen Abschnitten II und III die Besprechung der S y n t h e s e w e g e der Actinocinylpeptide nicht unnötig auszuweiten, wurden bei den einzelnen Verbindungen meist nur die zum Beweise der Reinheit und Identität nötigen analytischen Methoden aufgezählt. Nunmehr seien die Eigenschaften der neu dargestellten Präparate - Verhalten im Ringpapierchromatogramm, Absorptions-Spektren, spez. Drehungen und Löslichkeiten - in einer übersichtlichen "C h a r a k t e r i s t i k" im Zusammenhang dokumentiert.

a. Die Abbildungen 6-8 mögen einen Eindruck von den Wanderungsgeschwindigkeiten der Actinocinylpeptide im Ringchromatogramm geben. Alle Einzelheiten gehen aus der Beschriftung hervor.

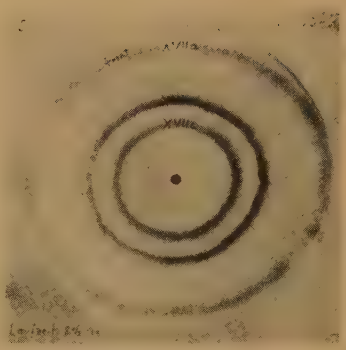
b. Schmelzpunkte besitzen nur die kristallinen Verbindungen XV (113-115°) und XVIa (222°, Zers.), alle anderen amorphen Körper zeigen ein völlig uncharakteristisches Sinterungsintervall von bis zu 50 Graden und schmelzen nicht. Der Sinterungsbeginn ist deshalb nur im experimentellen Teil vermerkt.

c. Die Wellenlängen der Maxima sind die gleichen wie in den Absorptionskurven des Actinomycins C: 238, 425, 444 mμ . Ein für alle Actinocinylpeptide charakteristisches Bild zeigt Abbild. 9.

d. Die auf das längstwellige Maximum bezogenen molaren Extinktionen (in Methanol) liegen etwas höher als beim Actinomycin C

Lediglich der Mono-prolinmethylester XVIIa zeigt einen niedrigeren Wert, der zudem für beide Maxima (428 u. 445 mμ) gilt.

e. Einzelheiten zur Messung der spez. Drehung, wie Temperatur, Konzentration und Fehlergrenze sind bei den betreffenden Verbindungen im experimentellen Teil verzeichnet.

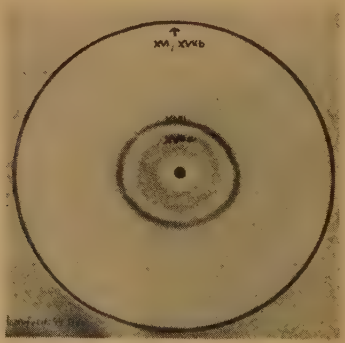


Abbild. 6

XVIa, XVIIa u. XVIIc (Säuren)
Isoamylalkohol/Phosphatpuffer pH 6
Laufzeit: 8,5 Stdn.

Abbild. 7

XVI, XVII, XVIIa u. XVIIb (Ester) tert. Amylalkohol/n-Dibutyläther/10 proz. Na-m-kresotinat (1:2:3)
Laufzeit: 3 Stdn.



Abbild. 8

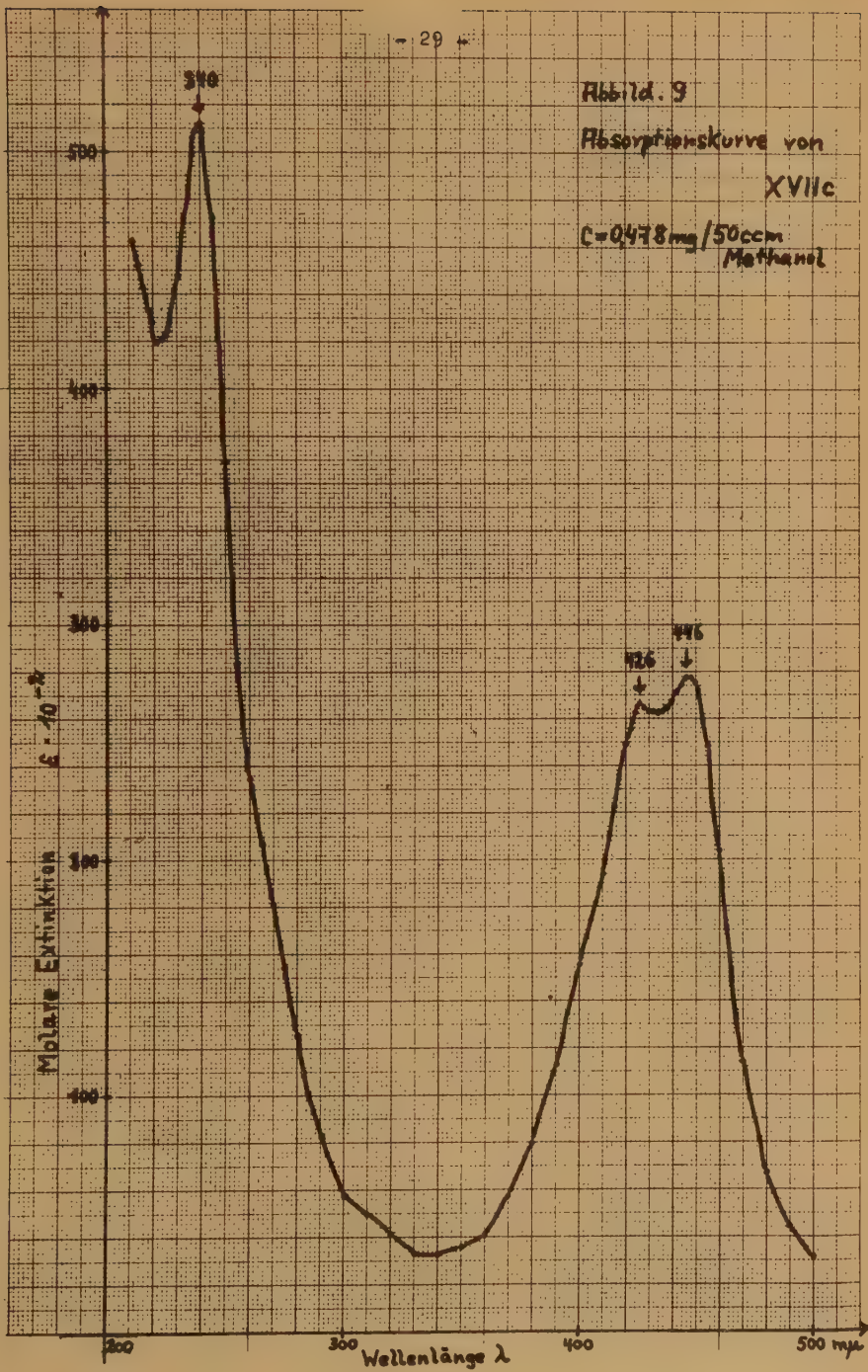
wie Abbild. 7

Laufzeit: 44 Stdn.

f. Löslichkeit. Alle auf S. 30 aufgeführten Verbindungen sind in Alkoholen, Pyridin und Tetrahydrofuran leichtlöslich.

Abkürzungen:

ll = leichtlöslich	hl = heiß löslich
l = löslich	wl = wenig löslich
ml = mäßig löslich	ul = unlöslich


Abbild. 9
Absorptionskurve von
XVIIc
c=0,478 mg/50 ccm
Methanol
310
426
446
500
400
300
200
Molare Extinktion ε · 10⁻³
Wellenlänge λ
300
400
500 mμ

Übersicht 6

Verbindungen:	Ziffer	spez. Drehung		Absorptions-Spektren		Löslichkeiten					
		$(\alpha)_D$	Lsgm.	Max.	Mol.Ext.	CH_2Cl_2	Egester Aceton Chlf.	Bzl.	H_2O	Cyclohexan	Äther Petr. Ä.
N-(2-Nitro-3-hydroxy-4-methyl-benzoyl)-Thr-Aileu-OCH_3, krist.	XV	-6,75°				ll	ll	l	ml	ul	ul
Act.-b-(Thr-Aileu-OCH_3)	XVI	-74° + 2°	Meth. Egester	428 446	 26 000	ll	ll	l	ul	ul	ul
Act.-b-(Thr-Aileu) amorph	XVIa	-69,5° -72,8° -68,0°	Meth.	425 444	 28 800	ml	wl	wl	wl	ul	ul
dass. krist.	XVIa	-72,2°	Meth.	426 446	 28 000						
N-(2-Nitro-3-hydroxy-4-methyl-benzoyl)-Thr. Aileu-Pro-OCH_3	XVIII					ll	ll	l	l	ul	ul
Act.-b-(Thr-Aileu-Pro-OCH_3	XVII	-178°	Meth.	428 446	 24 200	ll	ll	ml	wl	ul	ul
Act.-b-(Thr-Aileu)-mono-Pro-OCH_3	XVIIa	-95°	Meth.	428 445	20 400 20 400	l	l	hl	wl	ul	ul
Act.-b-(Thr-Aileu-Pro-Obz)	XVIIb	-67° -70°	Egester	428 446	 25 600	ll	ll	l	ul	wl	ul
Act.-b-(Thr-Aileu-Pro)	XVIIc	-100°	Meth.	426 446	 27 700	ml	ml	ll	ml	ul	ul
Act.-b-(Thr(-O-ac)-Aileu-Pro-Obz), S.31						ll	ll	ll	ul	ml	wl

D. Versuche zur Bildung von Actinocinyl-O-Peptiden

Nachdem es bisher gelungen war, Actinocinylpeptide mit sehr guten Ausbeuten in Mengen von einigen Gramm zu erhalten oder zumindest absolut zuverlässige Synthesewege aufzuzeigen, galt es nun niedrigere Homologe des Actinomycin C_3-Spaltproduktes A_{II} +) aufzubauen, d.h. die freie sek. alkoholische Hydroxygruppe des im Peptidverband verankerten L-Threonins mit der Carboxygruppe des N-Methyl-L-valins zu verestern. Gelänge die Bildung eines solchen O-Peptids, so wäre die Lactonisierung zu einem niedrigeren Homologen des Actinomycins C_3 (I) - in Analogie zur Recyclisierung des A_{II} zu I +) - der darauf folgende Schritt.

Die Aussichten, eine sek. alkoholische, innerhalb des großen Molekülverbands nicht leicht zugängliche Hydroxygruppe mit einer weiteren Aminosäure zu verestern, schienen nicht günstig. Immerhin gab es 2 Möglichkeiten:

a. Man verknüpft Methylvalin mit einem N-(2-Nitro-3-benzyloxy-4-methyl-benzoyl)-L-threonylpeptid und kondensiert die beiden Teile wie üblich zum Actinomycinchromophor, oder

b. man läßt Methylvalin erst mit dem "fertigen" Actinocinylpeptid reagieren.

Ich benutzte die 2. Möglichkeit, da die Actinocinylpeptide im Gegensatz zu den 3-Benzyloxy-Verbindungen sofort verfügbar waren.

Um zu sehen, ob die Hydroxyle des Threonins überhaupt reaktionsfähig sind, acetylierte ich XVIIb mit Acetanhydrid/Pyridin bei 20°. Im Chromatogramm, System tert. Amylalkohol/n-Dibutyläther/10 proz. wäßr. Natrium-m-kresotinat - (1:2:3) deutete eine neue, fast mit der Front laufende Zone und das völlige Verschwinden der Zone des eingesetzten XVIIb auf eine vollständige Acetylierung hin. Nach der Reinigung an neutralem Kieselgel erhielt ich den amorphen Actinocinyl-bis-(L-threonyl-(O-acetyl)-D-allo-isoleucyl-L-prolinbenzylester) in nahezu quant. Ausb. Die Acetylbestimmung zeigte genau 2 Acetylgruppen an.

+) W. Sunderkötter bezeichnet in seiner Dissertation[14] Actinomycin C_3 (I), dessen Peptidbindung er zwischen Sarkosin und Methylvalin in einer bzw. beiden Ketten hydrolytisch gespalten hatte, als A_I und A_{II} resp.

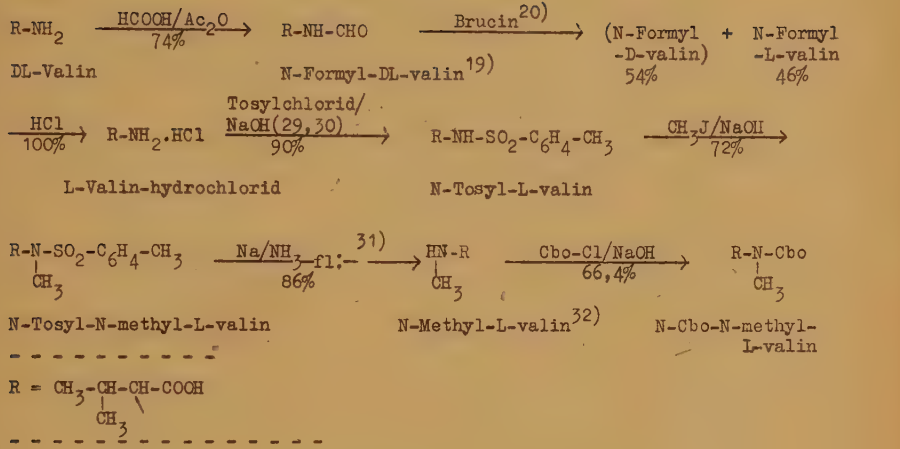
Die nächste Frage galt der Form, in der die Actinocinylpeptide eingesetzt werden müßten. Im Hinblick auf eine spätere Lactonisierung, die eine f r e i e Carboxygruppe an der endständigen Aminosäure erfordert, waren Methylester auszuschließen, weil bei ihrer Verseifung auch die O-Peptidbrücke wieder gespalten würde. Es bestand demnach nur die Wahl zwischen der Verwendung von Actinocinylpeptid-Säuren (z.B. XVIa u. XVIIc) und deren Benzylestern (z.B. XVIIb), die sich nach erfolgter Angliederung von Methylvalin leicht wieder hydrogenolytisch in die Säuren zurückverwandeln ließen.

M. Brenner u. Mitarb.[27], für die das Problem der anschließenden Cyclisierung nicht bestand, hatten meist Hydroxy-peptidalkylester mit dem gemischten Anhydrid aus Phosgen und einer Cbo-Aminosäure zu O-Peptiden verknüpft. Jedoch führten die Autoren in einer Tabelle auch die erfolgreiche Darstellung des O-(Cbo-Glycyl)-N-Cbo-Serins mit ungeschützter Carboxygruppe im Serin an.

Deshalb versuchte ich die Veresterung zuerst am Actinocinyl-bis-(L-threonyl-D-allo-isoleucin) (XVIa) nach der "Phosgenmethode". Im übrigen hielt ich mich an die Vorschrift von R. Mecke[28], dem es gelungen war, an Actinocinyl-bis-threoninmethyl e s t e r in ca 10 proz. Ausb. 2 Moll. Cbo-Methylvalin anzulagern. Außerdem war auch das "einseitige" O-Peptid entstanden.

Das für die Synthese wichtige N-Cbo-N-methyl-L-valin gewann ich aus DL-Valin in einem siebenstufigen Arbeitsgang[+], der an dieser Stelle nur kurz skizziert sei. Alle Einzelheiten bleiben dem experimentellen Teil vorbehalten.

+) Eine zusammenhängende Literaturvorschrift für die Synthese existiert nicht. Die Literaturangaben beziehen sich z.T. auf vergleichbare Fälle, jedoch ließen sich Angaben von U. Bahr (21) verwerten.



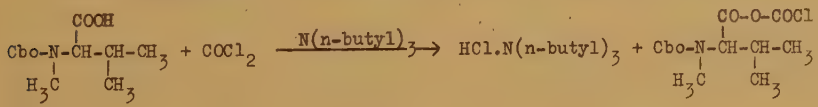
Die Übereinstimmung der spez. Drehungen des N-Methyl-L-valins mit Literaturangaben[32] war ausgezeichnet. Neben Methylvalin war im Papierchromatogramm nur noch eine Spur Valin zu erkennen.

Die Carbobenzoxylierung von Methylvalin erprobte ich zuerst an vorrätigem rac. Material. Sie gelang erst beim 3. Versuch, als der pH-Wert der Mischung konstant bei 10-11 lag; dies erreichte ich durch eine anfänglich gegenüber Cbo-chlorid stark verringerte Zugabe von 2n NaOH, die ich erst gegen Ende der insgesamt 5 Stdn. dauernden Reaktion ausglich. Das ölige Carbobenzoxy-N-methylvalin kristallisierte nach 2 Wochen im Vakuumexsikkator. Die Ausbeute betrug 80 % d. Theorie.

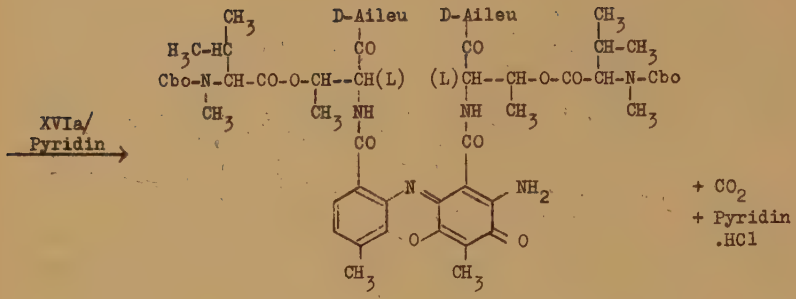
Bei Verwendung von N-Methyl-L-valin lag die Ausbeute bei 66 %, jedoch kristallisierte das scharf getrocknete Öl schon nach einigen Stunden.

I. Die "Phosgenmethode"[27]

1. Die Anlagerung von Cbo-methylvalin+) an XVIa läßt sich wie folgt formulieren:



+) Vorsichtshalber setzte ich zuerst das billigere rac. Präparat ein.



Cbo-methylvalin und Tri-n-butylamin ließ ich in abs. Tetrahydrofuran bei -70° mit einer Lösung der äquivalenten Menge Phosgen in Toluol zum gemischten Anhydrid reagieren. Hierzu goß ich die vorgekühlte Lösung von XVIa (0,9 mMol) in abs. Pyridin. Um einen möglichst hohen Umsatz zu erreichen, hatte ich die Komponenten so bemessen, daß das gemischte Anhydrid in mehr als der 3-fachen, für die Bildung eines A_{II}-Analogons nötigen Menge vorlag. Nach der üblichen Aufarbeitung erhielt ich einen Sirup, der noch das überschüssige Cbo-methylvalin enthielt.

Um die Cbo-Gruppe abzuspalten, hydrierte ich das rohe Reaktionsprodukt, filtrierte vom Katalysator und ausgefallenem, überschüssigen Methylvalin ab und wusch das nach dem Eindampfen erhaltene Öl nochmals zur restlosen Entfernung von Methylvalin mit Wasser. Der rote Sirup war unlöslich in 2n HCl, wurde aber teilweise von 0,4n $NaHCO_3$ aufgenommen.

Bei der papierelektrophoretischen Prüfung in einem Puffersystem vom pH 1,1 wäre zu erwarten gewesen, daß sich von der Startlinie 2 Zonen mit ähnlichen R_F-Werten wie A_I und A_{II} in Richtung auf die Kathode abgelöst hätten, stattdessen wanderte nur eine Zone mit der für Neutralkörper charakteristischen geringen Geschwindigkeit. Das Papierchromatogramm im System Isoamylalkohol/$\frac{m}{15}$ Phosphatpuffer pH 6,0 - (1:1) zeigte den vollständigen Umsatz von XVIa zugunsten zweier schneller-wandernder Zonen an.

Obwohl das dem Pherogramm entnommene Ergebnis als absolut zuverlässig gelten konnte, die Reaktion also in unbekannter Weise verlaufen war, versuchte ich trotzdem einen genaueren Einblick in die Art der Reaktionsprodukte zu gewinnen.

Der nun folgende Reinigungsprozeß war sehr langwierig, da das ölige Rohprodukt durch Umfällen und nach Maßgabe der Löslichkeit in 0,4n $NaHCO_3$ in viele pulvrige und ölige Fraktionen aufgeteilt werden mußte, die alle totalhydrolysiert wurden. Nur ein öliger Anteil - 40 % der Gesamtmenge - enthielt Methylvalin und wurde deshalb mehrmals an neutralem Kieselgel chromatographiert. Die Totalhydrolysate der Inhaltsstoffe der dabei eluierten Zonen ließen darauf schließen, daß das Rohprodukt der Kupplung aus Verbindungen bestand, die a) keine Aminosäuren, b) Threonin und Allo-isoleucin, c) nur Methylvalin (wohl als nicht abgetrennte Verunreinigung) und d) alle 3 Aminosäuren enthielten.

Einzig das Eluat der letzten schwachen Zone wurde weiter untersucht und festgestellt, daß der Chromophor nicht mehr rot, sondern hellgelb gefärbt war.

Nach den Ergebnissen der Papierchromatographie hatte dieser Versuch anstatt zur Anlagerung von Methylvalin zu einer Vielzahl saurer und neutraler Produkte geführt, die nicht zu definieren waren; jedenfalls muß die Reaktion sehr tiefgreifend gewesen sein.

In diesem Zusammenhang ist es von Interesse, daß H. Lackner zu ähnlichen unübersichtlichen Produkten gelangte, als er den Versuch mit Actinocinyl-bis-threonin anstelle von XVIa wiederholte.

2. Da es somit feststand, daß allein die ungeschützten Cbo-Gruppen (s.S. 32, R.Mecke[28]) den unerwünschten Reaktionsverlauf verursachten, setzte ich nunmehr in einem kleinen Ansatz (0,03 mMol) den Benzylester XVIIb der Einwirkung eines größeren Überschusses an gemischtem Anhydrid (0,5 mMol) unter sonst gleichen Bedingungen aus.

Die papierchromatographische Prüfung des Reaktionsproduktes im System tert. Amylalkohol/n-Dibutyläther/10 proz. wäßr. Natrium-m-kresotinat - (1:2:3) ergab, daß etwa 90 % des Ausgangsmaterials XVIIb noch vorhanden waren; 10 % hatten sich umgesetzt und wanderten mit der Lösungsmittelfront. Das Pherogramm (pH 1,1) einer, zwecks Abspaltung der Cbo- u. Benzylgruppe mit Palladium-Kohle hydrierten Probe zeigte deutlich eine mit A_I[+)] vergleichbare

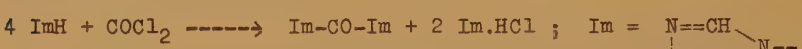
+) s. Fußnote S. 31.

Zone, die ca 10 % der Gesamtmenge ausmachte. Eine zweiseitige Anlagerung von Methylvalin hatte also nicht stattgefunden.

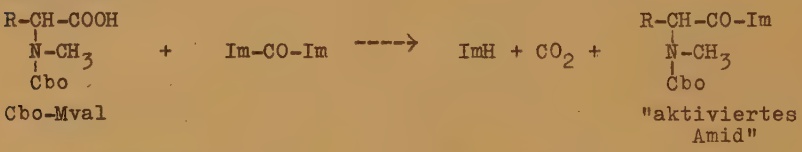
II. Kupplung mit N,N'-Carbonyl-diimidazol

Da die Ausbeute bei der "Phosgenmethode" recht unbefriedigend war, mußten noch andere Möglichkeiten ausgeschöpft werden, die ebenfalls auf der intermediären Bildung aktiver Zwischenstufen beruhten.

Hier bot sich die Verwendung von N,N'-Carbonyl-diimidazol an, dessen Wirksamkeit sich aus der Bildung eines aktivierten Amids[33] herleitet. Die Darstellung erfolgte nach H.A. Staab[34] aus Imidazol und Phosgen:



Die Umsetzung mit dem Benzylester XVIIb wäre wie folgt zu formulieren:



In einem Probeversuch[+] löste ich XVIIb zusammen mit Carbonyl-diimidazol und Cbo-methylvalin in abs. Methylenchlorid, erhitzte kurz und ließ über Nacht stehen. Das Chromatogramm zeigte nur unverändertes XVIIb an. Daraufhin ersetzte ich Cbo-methylvalin durch Methylvalin-hydrochlorid, welches ich in Tetrahydrofuran suspendierte, mit gelöstem Carbonyl-diimidazol schüttelte und kurz erhitzte. Nach Zugabe von XVIIb kochte ich nochmals kurz auf und prüfte nach 1 Stde. im Chromatogramm. Eine schwache Zone lief XVIIb voraus; nach 2 Tagen war der Umsatz quantitativ.

Im Pherogramm löste sich keine Zone von der Startlinie. Da Methylvalinhydrochlorid in allen inerten Lösungsmitteln unlöslich

+) Sämtliche folgenden Probeversuche wurden mit sehr kleinen Mengen ausgeführt. Actinocinylpeptid: ca 5 x 10^{-3} mMol; Methylvalin-Komponente im Überschuß, ca 0,1-0,15 mMol.

war, hatte Carbonyl-diimidazol wahrscheinlich nur mit der Hydroxygruppe des Threonins reagiert:

(XVIIb) $\overset{|}{\underset{|}{CHOH}}$ + Im-CO-Im ------> ImH + $\overset{|}{\underset{|}{CH}}$-O-CO-Im.

III. Kupplung nach Schotten-Baumann

Der Gedanke, eine Veresterung durch Einsatz von Aminosäurechloriden zu erreichen, geht auf das alte Verfahren von Schotten-Baumann zurück, doch auch L. Velluz u. Mitarb. berichteten neuerdings[35] über die Bildung von O-Glycyl-serin-dihydrochlorid aus N,N-Dibenzyl-serin, N,N-Dibenzyl-glycylchlorid-hydrochlorid und Triäthylamin in Chloroform.

1. Nach einer Analogievorschrift[9] bereitete ich N-Cbo-N-methyl-valylchlorid aus Cbo-methylvalin und Phosphorpentachlorid unter Äther. Die schuppigen Kristalle des Chlorids (Schmp. 35°) sind überempfindlich gegenüber Wasser und zersetzen sich beim Erwärmen zu Benzylchlorid und Leuchs'schem Anhydrid.

XVIIb und Cbo-methylvalylchlorid ließ ich in absolutem Methylenchlorid mit der äquivalenten Menge Pyridin über Nacht bei 20° reagieren. Ich wiederholte den Versuch auch mit mehr Pyridin. In beiden Fällen hatte dem Pherogramm nach keine Anlagerung stattgefunden.

2. In der Annahme, Cbo-methylvalylchlorid habe vielleicht wegen der räumlichen Ausdehnung seiner Cbo-gruppe oder auf Grund der enormen Zersetzlichkeit nicht wie beabsichtigt reagiert, setzte ich nun die Versuche mit dem etwas beständigeren Methylvalylchlorid-hydrochlorid fort. Dieses Präparat erhielt ich nach einer neueren Vorschrift[36] in 92 proz. Ausbeute als Rohprodukt durch 10-stünd. Schütteln einer Lösung von Methylvalin in abs. Tetrachlorkohlenstoff mit Phosphorpentachlorid. Da das Chlorid auch im Vakuumexsikkator höchstens eine Woche lang beständig war, wurde der Ansatz mehrmals, auch mit Methyl-L-valin wiederholt.

Während voraussichtlich ein größerer Überschuß des Säurechlorid-hydrochlorids nicht schadete, mußte die Menge des Pyridins möglichst klein gehalten werden, damit diese Base nicht mit Methylvalylchlorid-hydrochlorid in Konkurrenz um die salzartig gebundene Chlorwasserstoffsäure tritt. Methylvalylchlorid

mit freier Aminogruppe könnte sonst polymerisieren, bevor die erwünschte Veresterung zustande kommt.

In Reihenversuchen wurden die drei Reaktionspartner, XVIIb, Methylvalylchlorid-hydrochlorid und Pyridin wie üblich in Methylenchlorid vereinigt, wobei die Lösungen nach etwa halbstündigem Stehen eine deutlich tiefere Rotfärbung annahmen. Die chromatographische und besonders die elektrophoretische Untersuchung ergab folgendes:

a. Kurzzeitiges Erhitzen der Lösung erübrigte sich, falls diese mindestens 20 Stdn. bei 20° sich selbst überlassen blieb. Mehrtägiges Stehen hatte keinen sichtbaren Einfluß.

b. Etwa die Hälfte des Ausgangsmaterials lag unverändert vor. Neben ca 20 % der A_I-analogen Verbindung war auch ein tiefer gefärbtes Nebenprodukt entstanden.

c. Eine Umsetzung trat nur bei Zugabe von 2-3 Äquivalenten Pyridin ein; ohne oder mit 20 Äquivalenten entstanden höchstens unbekannte Nebenprodukte.

Leider ließ sich die Bildung eines A_I-Homologen nur zweimal im Pherogramm beobachten. Trotz einer Vielzahl von Wiederholungsversuchen, wobei ich sowohl Methylvalylchlorid-hydrochlorid, als auch XVIIb aus verschiedenen Ansätzen erprobte, war eine Anlagerung nicht reproduzierbar.

Jedoch kam ich zu interessanten Ergebnissen, als ich die Aktivität des Methylvalylchlorid-hydrochlorids an anderen Actinocinylpeptiden überprüfte. Unter den ermittelten günstigsten Bedingungen erreichte ich am Actinocinyl-bis-L-threonin-methylester[+)] und Actinocinyl-bis-(L-threonyl-D-allo-isoleucin-methylester) (XVI) eine ca 50 bzw. 20 proz. einseitige Angliederung, ja es gelang sogar, Methylvalylchlorid-hydrochlorid mit Actinomycin Xoδ [++)] nach 1-tägigem Stehen in ca 50 proz., nach 4 Tagen in ca 90 proz. Ausbeute zu verknüpfen. Alle diese Ergebnisse sind durch öftere Wiederholung der Versuche gesichert.

+) Eine Probe des Präparats stellte mir Herr H.-S. Petras freundlicherweise zur Verfügung.

++) Actinomycin Xoδ enthält in e i n e r Peptidkette Allohydroxyprolin anstelle von Prolin. Im Rahmen seiner Doktorarbeit führte G. Troemel diesen Versuch nach meinen Angaben mit dem von mir dargestellten Methylvalylchlorid-hydrochlorid aus.

Zieht man das Fazit aus den obigen Versuchen, so ersieht man, daß die im einzelnen empirisch ermittelten Bedingungen der allgemeinen Methode von Schotten-Baumann gut gewählt waren. Wenn sich die vier untersuchten Actinocinyl-peptide unter genau gleichen Versuchsbedingungen im Hinblick auf die Ausbeuten dennoch so verschiedenartig verhielten, so hing das wohl davon ab, in welchem Maße die im Molekülknäuel eingebetteten sek. Hydroxygruppen einem Angriff von außen überhaupt zugänglich waren, - d.h. von sterischen Faktoren. Inwieweit der elektropositive Ammoniumstickstoff des Methylvalins im A_I-Homologen den Eintritt eines 2. Moleküls Methylvalin zu stören vermag, ist schwer zu sagen. Immerhin erscheint es mir bei dem verwendeten großen Überschuß an Methylvalylchlorid-hydrochlorid unwahrscheinlich, daß sich ein p r ä p a r a t i v isoliertes A_I-Homologes bei erneuter Einwirkung des Säurechlorids in ein A_{II}-Produkt überführen ließe.

3. Obwohl in der vorliegenden Arbeit nur die Möglichkeiten für eine O-Peptidbildung an A c t i n o c i n y l - peptiden gefunden werden sollte, wollte ich abschließend noch das Verhalten des N-Methylvalylchlorid-hydrochlorids gegenüber N-(2-Nitro-3-benzyloxy-4-methyl-benzoyl)-L-threonin-benzylester+) studieren. Allerdings war bekannt, daß sich die Benzylgruppe am Threonin nicht oder nur in geringem Maße abspalten läßt; der geeignetere N-(2-Nitro-3-benzyloxy-4-methyl-benzoyl)-L-threonyl-D-allo-isoleucin-benzylester stand mir aber leider nicht zur Verfügung.

In gewohntem Mengenverhältnis ließ ich beide Reaktionspartner unter Zugabe von Pyridin in Methylenchlorid miteinander reagieren. Auf dem Pherogramm war unter der UV-Lampe eine knapp 10-proz. Veresterung mit Methylvalin abzuschätzen. Die Hydrierung nahm ich sehr energisch nacheinander mit Raney-Nickel, Platinoxyd und Palladium bei zeitweiliger Erwärmung mit dem Föhn vor und oxydierte darauf mit Kalium-hexacyanoferrat-III. Ein Chromatogramm im System Isoamylalkohol/$\frac{m}{15}$ Phosphatpuffer pH 6,0 (1:1) mit Actinocinyl-bis-threonin als Vergleichssubstanz zeigte, daß die Benzylester-gruppen nicht gespalten worden waren. Im Pherogramm war nur eine sehr schwache Zone eines einseitigen

+) Für die Überlassung einer kleinen Probe danke ich Herrn V. Graef.

Anlagerungsprodukts zu erkennen. Daß keine A_{II}-analoge Verbindung entstanden war, ist einleuchtend, da die geringe Menge des nicht isolierten N-(2-Nitro-3-benzyloxy-4-methyl-benzoyl)-O-methylvalyl-L-threoninbenzylesters nach der Reduktion vornehmlich mit unsubstituierten Molekülen reagiert hatte.

E. Zusammenfassung der Ergebnisse

Die Synthese des racemischen Carbobenzoxy-seryl-prolyl-alanyl-leucyl-glycin-methylesters wurde auf zwei Wegen durchgeführt, doch gelang es nicht, aus diesem Ester durch Hydrierung und Verseifung das reine Pentapeptid zu gewinnen.

An Actinocinyl-peptiden wurden dargestellt: Actinocinyl-bis-(L-threonyl-D-allo-isoleucin), Actinocinyl-bis-(L-threonyl-D-allo-isoleucyl-L-prolin) sowie mehrere Derivate. Dabei gelang es, ohne die zeitraubende chromatographische Reinigung der Zwischenprodukte zu reinen Actinocinylpeptiden zu gelangen, die vielfach als Vergleichssubstanzen zur Kontrolle des hydrolytischen Abbaus von Actinomycin C_3 dienten.

Mit Hilfe mehrerer Methoden wurden die Möglichkeiten zur Gewinnung von Actinocinyl-O-Peptiden - d.h. die Veresterung der Hydroxy-gruppe im Threonin mit der Carboxygruppe des N-Methylvalins - untersucht. Die papierelektrophoretische Verfolgung der Reaktionen zeigte, daß in keinem Fall eine Veresterung beider Threoninreste zu erreichen war. Auch die Veresterung von nur einem Threonin-Rest gelang in erträglichen Ausbeuten nur bei "kurzen" Actinocinyl-peptiden. Aus den Versuchen wurde die vermutlich starke sterische Hinderung der von Natur aus schon trägen sek. alkoholischen Hydroxygruppen besonders deutlich. Wahrscheinlich wird man in Zukunft die O-Peptidbrücke zuerst zwischen Threonin und N-Methylvalin allein knüpfen müssen und erst später den Chromophor und weitere Peptidketten anhängen können.

B E S C H R E I B U N G d e r V E R S U C H E

(Zu Abschnitt B)

N-Carbobenzoxy-serin (II)[9] Zu der mit einem V i b r o - M i s c h e r bei 0° kräftig gerührten Lösung von 21 g DL-Serin (0,2 Mol) in 100 ccm 2n NaOH gab man innerhalb 2 Stdn. abwechselnd in je 10 Portionen insgesamt 34 g (0,2 Mol) Carbobenzoxychlorid und 100 ccm 2n NaOH. Man rührte noch 1 Stde. bis zur Klärung der Mischung, extrahierte überschüssiges Cbo-chlorid mit Äther und säuerte die wäßr. Phase mit konz. Salzsäure stark an, wobei sich ein farbloses, bald kristallisierendes Öl abschied. Das Rohprodukt wurde abgesaugt, mit Wasser gewaschen, getrocknet (44 g) und aus 140 ccm Essigester umkristallisiert. Feine, verfilzte Nadeln vom Schmp. 122-125°. Ausb. 37 g (77,5 % d.Th.)

L-Prolinmethylester-hydrochlorid (III)[10] Unter mech. Rühren fügte man 7,9 ccm (0,11 Mol) reinstes Thionylchlorid portionsweise zu 30 ccm (0,78 Mol) Methanol, welches sich in einem mit Eis/Kochsalz-Mischung gekühlten und mit Anschütz-Aufsatz und Quecksilberverschluß versehenen Kolben befand. Anschließend löste man nach und nach 11,5 g (0,1 Mol) L-Prolin in der gerührten Mischung auf, wobei die Temperatur -5° nicht übersteigen durfte, erwärmte 1 Stde. langsam bis auf 40° und rührte bei dieser Temperatur weitere 2 Stunden. Methanol, Schwefeldioxyd- u. Chlorwasserstoffdämpfe wurden i. Vak. abdestilliert, zuletzt 1 Stde. aus einem Bad von 100°. Der zurückgebliebene, hellbraune Sirup erstarrte nach 3 Tagen im Vakuumexsikkator über Ätznatron zu einer sehr hygroskopischen Kristallmasse. Ausb. 15,5 g (94 % d.Th.)

N-Cbo-seryl-prolin-methylester (IV) (Beispiel für die Methode des "Gemischten Anhydrids") Mengenangaben je 0,025 Mol: Zu einer vor Feuchtigkeit geschützten Lösung von 5,98 g Cbo-serin (II) und 5,94 ccm Tri-n-butylamin in 50 ccm abs. Toluol ließ man bei -5° bis -10° unter Rühren 2,39 ccm Chlorkohlensäure-äthylester zufließen. Nach 15 Min. goß man eine auf -5° vorgekühlte Mischung von 4,14 g III und 5,94 ccm Tri-n-butylamin in 50 ccm abs. Chloroform zu und rührte im Kältebad weitere 2 Stdn. Die Lösung, die über Nacht bei 20° gestanden hatte, verdünnte man mit einem gleichen Volumen Essigester und wusch nacheinander mit Wasser, 2n HCl, Wasser, 0,4n $NaHCO_3$, Wasser. Die trüben

Waschwässer wurden einzeln mit Äther durchgeschüttelt, die Ätherauszüge mit der organischen Phase vereinigt, über geglühtem Natriumsulfat getrocknet und i. Vak. eingedampft.
Ausb. 6,5 g hellbraunes Öl (74 % d.Th.)
$C_{17}H_{22}O_6N_2$ (350,3): Ber. N 8,0 Gef. N 7,14
8 Stdn. bei 40° i. Hochvak. getrocknet.

N-Cbo-seryl-prolin (V) 1. Eine Lösung von 1,07 g IV in 15 ccm Aceton/Methanol - (2:1) wurde mit 1,75 ccm 2n NaOH (ca 1,15 val) 1 Stde. bei 20° verseift. Darauf engte man i. Vak. weitgehend ein, verdünnte mit 15 ccm Wasser, entzog der Emulsion den unverseiften Ester mit Äther, säuerte die wäßr. Phase mit Salzsäure an und extrahierte mit Essigester. Nach dem Trocknen und Eindampfen i. Vak. blieben 0,34 g Öl zurück. Ausb. 33 % d.Th. - Das unverseifte Ausgangsmaterial wurde zurückgewonnen. Verschiedene Variationen sind zusammengestellt in

Tabelle 1

Ansatz Nr.	Medium	2n NaOH in Äquival.	Verseifungsdauer	Temp.	Ausbeute %
2	Methanol	1,15	115 Min.	20°	24
3	Äther+)	2,0	60 "	"	15
4	Methanol	2,0	3,5 Stdn.	"	23,6
5	Meth/Acet. (1:1)	2,4	9 "	"	26,2
6	Methanol	2,4	90 Min.	40-50°	12

+) mechanisch geschüttelt

Seryl-prolin-hydrobromid. 0,34 g V löste man in 2 ccm Eisessig, gab 1 ccm einer 30-proz. Lösung von Bromwasserstoff in Eisessig zu, engte nach 40 Min. i. Vak. auf 1 ccm ein und fällte mit 10 ccm Äther ein dunkles Öl aus, das noch zweimal mit Äther zur Entfernung von Benzylbromid digeriert und anschließend i. Vak. über Ätznatron getrocknet wurde. Braune, hygroskopische Masse, die noch nach Benzylbromid roch. Ausb. 54 mg (19 % d.Th.)

Papierchromatographischer Nachweis von Seryl-prolin. (Beispiel einer Totalhydrolyse) Im Ringpapierchromatogramm+) im System n-Butanol/Eisessig/Wasser - (4:1:5) wanderte Serylprolin

+) Alle Chromatogramme wurden auf Schleicher & Schüll Papier Nr. 2043b gemacht.

17 Stdn. Nach dem Trocknen schnitt man im rechten Winkel zueinander 4 schmale Streifen aus und entwickelte die unsichtbaren Zonen mit Ninhydrin (0,1 % in wassergesättigtem n-Butanol) bei 110°. Die Streifen fügte man wieder in den Bogen ein, ergänzte die beiden sichtbaren Zonenstücke mit dem Bleistift zum Kreis und schnitt die äußere, Serylprolin enthaltende Zone in Form von 4 Kreisbögen aus. Durch viermaliges, aufsteigendes Ansaugen von 0,1n HCl und Lufttrocknen konzentrierte man das Dipeptid am oberen Ende jedes Streifens, schnitt je 1,5 cm ab, kochte die 4 Papierschnitzel 5 Min. in 0,1n HCl, saugte ab, dampfte in einer kleinen Schale ein, nahm mit 0,3 ccm halbkonz. Salzsäure auf, schmolz die Flüssigkeit in ein Glührörchen ein und hydrolysierte über Nacht bei 120°. Das Totalhydrolysat wurde auf einem Uhrglas im Vakuumexsikkator über Ätznatron eingedampft, mit 0,1 ccm 0,1n HCl aufgenommen und auf ein Rundchromatogramm gegen Serin und Prolin aufgetragen. Nach 17-stünd. Laufzeit trocknete man das Papier, besprühte die eine Hälfte mit Ninhydrin, die andere mit Isatin (1 g in 480 ccm Aceton u. 20 ccm Eisessig). Serin wurde durch Ninhydrin rotviolett, Prolin durch Isatin blau angefärbt.

Alanyl-leucyl-glycinmethylester-hydrochlorid (VI) wurde ebenso wie III dargestellt: 5,87 g (0,023 Mol) krist. Alanyl-leucyl-glycin (Zers.P. ca 215°), 1,78 ccm Thionylchlorid; 6,75 ccm Methanol.
Glasig erstarrte weiße Masse. Ausb. 6,9 g (98,5 % d.Th.)

N-Cbo-seryl-prolyl-alanyl-leucyl-glycinmethylester (VII)
Syntheseweg (a). Allgemeine Darstellung wie bei IV. Mengenangaben je 4,5mMol:
1,52 g V u. 1,07 ccm Tri-n-butylamin in 10 ccm abs. Toluol
0,43 ccm Chlorkohlensäure-äthylester
1,4 g VI u. 1,07 ccm Tri-n-butylamin in 10 ccm abs. Chloroform.
Ausbeute: 1,47 g gelbbrauner Sirup, 55 % d.Th.
$C_{28}H_{41}O_9N_5$ (591,6): Ber. N 11,8 Gef. 10,25
8 Stdn. i. Hochvak. bei 40° getrocknet.

Die beim erstmaligen Waschen mit Wasser ausgefallenen Flocken, die eine starke Emulsion verursachten, wurden zentrifugiert und sammelten sich zwischen den beiden Phasen an. 70 mg eines weißen, amorphen Pulvers, das sich nur in Eisessig löste und aus diesem mit Wasser umgefällt wurde. Bis 300° unschmelzbar.

Elementaranalyse des Polypeptids: Gef. C 59,73 H 5,54 N 7,58
Getrocknet i. Hochvak. bei 100°. (nach Abzug des unverbrennbaren Rückstands von 0,81 %)

Cbo-prolyl-alanyl-leucyl-glycinmethylester (VIII).

Allgemeine Darstellung wie bei IV. Mengenangaben je 9 mMol:

2,24 g Cbo-L-prolin[12] u. 2,14 ccm Tri-n-butylamin in 20 ccm abs. Toluol,
0,86 ccm Chlorkohlensäure-äthylester
2,8 g VI u. 2,14 ccm Tri-n-butylamin in 20 ccm abs. Chloroform.

Ausbeute: 3,69 g hellgelbe, gelatineartig erstarrte Masse. 81 % d.Th.

$C_{25}H_{36}O_7N_4$ (504,5): Ber. N 11,1 Gef. N 10,23

7 Stdn. i. Hochvak. bei 45° getrocknet.

Prolyl-alanyl-leucyl-glycinmethylester-hydrochlorid (IX)

(Beispiel für die hydrogenolytische Abspaltung der Cbo-Gruppe)
Eine Lösung von 3,69 g VIII in ca 50 ccm Methanol versetzte man mit 0,56 ccm (1 Äquivalent) rauch. Salzsäure und ca 300 mg 5-proz. Palladium-Kohle und schüttelte unter Durchleiten von strömendem Wasserstoff bis sich nach 1 Stde. in einer dahintergeschalteten Waschflasche mit frischem Barytwasser kein Bariumcarbonat mehr abschied. Der Katalysator wurde abfiltriert und die Lösung i. Vak. eingedampft.
Ausb. 3,03 g spröder, glasiger Rückstand; 99,6 % d.Th.

N-Cbo-seryl-prolyl-alanyl-leucyl-glycinmethylester (VII)

Syntheseweg (b). Allgemeine Darstellung wie bei IV, S. 41.
Mengenangaben je 7,3 mMol:

1,74 g Cbo-serin (II) u.
1,73 ccm Tri-n-butylamin in 20 ccm abs. Toluol
0,69 ccm Chlorkohlensäure-äthylester
2,97 g IX u. 1,73 ccm Tri-n-butylamin in 20 ccm abs. Chloroform.

Ausb. 1,50 g gelbbrauner Sirup, 34,8 % d.Th.

Seryl-prolyl-alanyl-leucyl-glycinmethylester-hydrochlorid

Allgemeine Darstellung wie bei IX:

1,43 g VII in 20 ccm Methanol; 0,2 ccm rauch. Salzsäure; 200 mg Pd/C (5 %)

Ausb. 1,13 g teilweise krist. weiße Masse; 94 % d.Th.

Verseifung zu Seryl-prolyl-alanyl-leucyl-glycin. 1,13 g Seryl-prolyl-alanyl-leucyl-glycinmethylester-hydrochlorid (2,3 mMol) verseifte man 1 Stde. mit 19 ccm 0,3 n (gesättigt) $Ba(OH)_2$

(2,88 mMol = 2,5 Äquivalente) unter öfterem Umschwenken des verschlossenen Kolbens, ätherte die Lösung aus, neutralisierte mit n H_2SO_4 bis pH 7,0 ± 0,2, filtrierte vom Bariumsulfat ab, dampfte das Filtrat i. Vak. ein und laugte den Rückstand mehrmals mit heißem abs. Äthanol aus. Beim Filtrieren der erkalteten alkoholischen Lösung blieb Bariumchlorid ungelöst zurück. Das alkoholische Filtrat lieferte nach dem Eindampfen i. Vak. 0,88 g einer weißen, glasig-amorphen Masse,

$C_{19}H_{33}O_7N_5$ (443,4): Ber. C 51,4 H 7,48 N 15,79
Gef.+) 52,02 8,02 12,45

8 Stdn. i. Hochvak. bei 60° getrocknet.
+) Nach Abzug des unverbrennbaren Rückstands von 27,5 %.

0,58 g des noch Barium enthaltenden Pentapeptids löste man in 2 ccm Wasser und tropfte n H_2SO_4 zu bis gerade keine Trübung von Bariumsulfat mehr auftrat. Das i. Vak. eingedampfte Filtrat (0,41 g) besteht aus Pentapeptid-hydrochlorid und (wenig) -sulfat.

Seryl-prolyl-alanyl-leucyl-glycinmethylester.
Allgemeine Darstellung wie bei IX, S. 44.
0,61 g VII in 15 ccm Methanol, 200 mg Pd/C (5 %), o h n e Salzsäure, 2 Stdn. hydriert. Ausb. 0,44 g, 93 % d.Th.

Verseifung zu Seryl-prolyl-alanyl-leucyl-glycin. 0,44 g (0,98 mMol) Seryl-prolyl-alanyl-leucyl-glycinmethylester verseifte man 1 Stde. mit 4 ccm (0,6 mMol = 1,25 Äquivalente) 0,3n $Ba(OH)_2$ unter öfterem Umschwenken des verschlossenen Kölbchens, gab 12 ccm Wasser zu, extrahierte mit Äther und leitete in die wäßr. Lösung Kohlendioxyd ein. Zur Zusammenballung des ausgefallenen Bariumcarbonats erhitzte man kurz, kühlte ab und filtrierte, wusch gut mit kaltem Wasser nach und dampfte i. Vak. ein. Ausb. 0,19 g farbloses, erstarrtes Glas.

$C_{19}H_{33}O_7N_5$ (443,4): Ber. C 51,4 H 7,48 N 15,79
Gef.+) 56,86 8,23 16,4

8 Stdn. i. Hochvak. bei 60° getrocknet.
+) Nach Abzug des unverbrennbaren Rückstands von 24 %.

0,17 g des offenbar noch Barium enthaltenden Pentapeptids löste man in 2 ccm Wasser, kochte auf und tropfte n H_2SO_4 zu bis gerade keine Trübung von Bariumsulfat mehr auftrat. Nach Zugabe von 1 ccm n HCl dampfte man i. Vak. ein und erhielt 95 mg des Pentapeptid-hydrochlorids im Gemisch mit (wenig) -sulfat.

Potentiometrische Titration (Siehe Abbildungen S. 11)

Wie im einzelnen aus Tabelle 2 hervorgeht, wurden meistens 0,1 mMol der Aminosäure oder des Peptids eingewogen, 1,0 ccm 0,1n HCl zugegeben, über einem siedenden Wasserbad zur Trockene eingedampft, der Rückstand entweder in 5 ccm Methanol/35-proz. Formalinlösung/Wasser - (9:2:1) oder Methanol/Wasser - (3:1) gelöst und mit 0,1n methanolischer NaOH potentiometrisch titriert. Die Spitze der 5 ccm fassenden Mikrobürette tauchte in die magnetisch gerührte Flüssigkeit ein. Das verwendete Glas-Kalomel-Elektrodenpaar stand mit dem pH-Meter 22 (Fa Radiometer Kopenhagen) in Verbindung.

Tabelle 2

	HCl·Serin	HCl·Prolin	HCl·Gly-Ala-Phe	HCl·Gly-Leu	Ala-Leu-Gly·HCl mit Formalin	Ala-Leu-Gly·HCl ohne Formalin	HCl·Ser-Pro-Ala-Leu-Gly Ansatz 1 mit Formalin	HCl·Ser-Pro-Ala-Leu-Gly Ansatz 1 ohne Formalin	HCl·Ser-Pro-Ala-Leu-Gly Ansatz 2 mit Formalin	HCl·Ser-Pro-Ala-Leu-Gly Ansatz 2 ohne Formalin
Einwaage (mMol)	0.1	0.1	0.115		0.1	0.1	0.1	0.1	0.098	0.098
$\ddot{A}P_1$ (Skt.)	5.05	6.14	6.62			6.72	3.20	3.50	3.46	3.62
Halbstufenpotential (Skt)	3.60	3.50	4.75			5.00	2.20	2.40	—	—
ccm 0.1n methan. NaOH	0.95	1.05	1.05			1.00	0.80	0.75	0.20	0.17
$\ddot{A}P_2$ (Skt.)	9.00	10.21	10.41		9.00	10.15	8.80	9.80	8.30	9.63
Halbstufenpotential (Skt)	6.58	8.65	8.32		5.00	8.19	5.50	5.60	5.30	5.50
ccm 0.1n methan. NaOH	1.92	2.05	2.25		2.02	1.98	2.57	2.54	1.67	1.55
Δ ccm NaOH, $\ddot{A}P_2$-$\ddot{A}P_1$	0.97	1.00	1.20		2.02	0.98	1.77	1.79	1.47	1.38
dass. berechnet:	1.00	1.00	1.16		2.00	1.00	2.00	2.00	1.96	1.96
							ca 90% rein		ca 73% rein	

Bestimmung des Gesamtstickstoffs nach Kjeldahl

Vergleichsbestimmung: 3 ccm 0,1m wäßr. Glycinlösung versetzte man mit 3 ccm konz. Schwefelsäure, einer Spatelspitze Kaliumsulfat und 2-3 mg Selenpulver, kochte 1 Stde. in der Kjeldahl-Birne, ließ erkalten und fügte 10 ccm Wasser und 20 ccm 30-proz. Natronlauge zu. In der Kjeldahl-Mikroapparatur trieb man den Ammoniak in vorgelegte 5 ccm 0,1n HCl über und titrierte mit 2,01 ccm 0,1n NaOH zurück. Verbrauch: 2,99 ccm 0,1n HCl; ber. 3,00 ccm.

Bestimmung des Pentapeptid-hydrochlorids (1. Ansatz, S. 7):
Je 1,25 ccm 0,04 m wäßr. Ser-Pro-Ala-Leu-Gly.HCl-Lösung wurden wie oben aufgeschlossen.

$C_{19}H_{34}O_7N_5Cl$ (479,9):	1. Analyse	2. Analyse
Verbrauch (ccm 0,1n HCl):	2,00	2,01
entspricht mg N :	2,80	2,82
Gesamtstickstoff in %, Gef.	11,66	11,73
" Ber.	14,6	14,6

Bestimmung des endständigen Aminostickstoffs nach van Slyke[15)]
Für 2 Analysen wurden je 2,5 ccm 0,04 m wäßr. Ser-Pro-Ala-Leu-Gly.HCl-Lösung (1. Ansatz, S. 7) eingesetzt.

$C_{19}H_{34}O_7N_5Cl$ (479,9):	1. Analyse	2. Analyse
Druck, Temperatur:	753 Torr, 20°	740 Torr, 20°
Brutto-N (ccm) :	1,09	1,13
abzügl. Blindwert (ccm):	0,19	0,20
Netto-N (ccm) :	0,90	0,93
entspricht mg N :	0,507	0,515
van Slyke-Stickstoff in %, Gef.	1,05	1,07
" " Ber.	2,92	2,92

(Zu Abschnitt C)

Carbobenzoxy-L-threonin (X) a. 10 g (0,084 Mol) L-Threonin löste man in 42 ccm 2n NaOH und gab unter Eiskühlung und Rühren mit dem Vibromischer innerhalb von 4 Stunden 15,5 g (0,091 Mol) Cbo-chlorid und 23 ccm 4n NaOH portionsweise zu. Als die Mischung nach insgesamt 5 Stdn. nicht klar geworden war, extrahierte man mit Äther, säuerte die wäßr. Phase mit 6n HCl an und nahm das ausgeschiedene Öl in Essigester auf. Nach dem Trocknen über Natriumsulfat und Eindampfen i. Vak. blieben 7,45 g eines farblosen Sirups zurück, welcher nach 5 Monaten durchkristallisiert war. Eine Umkristallisation gelang nicht.
Ausb. 35,2 % d.Th. $(\alpha)_D^{20}$: -1,05 ± 0,5° (c 3,2 in Methanol)

b.[18)] 11,9 g (0,1 Mol) L-Threonin löste man in 225 ccm frisch angesetzter, gesättigter wäßr. Natriumhydrogencarbonat-Lösung, gab 22,8 g (0,134 Mol) Cbo-chlorid zu und rührte bei 25° 3,5 Stdn. mit dem Vibromischer. Aufarbeitung wie unter a.
Ausb. 24,55 g farbloser Sirup, 97 % d.Th. $(\alpha)_D^{20}$: -1,74 ±0,4° (c 4,1 in Methanol).

Formyl-isoleucin-Gemisch. 200 g Isoleucin pract. (Fa Fluka) wurden in 1 l Ameisensäure (98-100 %, pa.) gelöst, auf 50° erwärmt und bei aufgesetztem Rückflußkühler 600 ccm Acetanhydrid zugegeben, wobei die Mischung ins Sieden geriet. Man hielt 40 Min. im Wasserbad bei 75°, dampfte i. Vak. zur Sirupkonsistenz ein, digerierte mit 600 ccm heißem Wasser und goß nach dem Abkühlen noch 44 ccm rauch. Salzsäure zu. Über Nacht schieden sich im Kühlschrank Kristalle ab, die abgesaugt, mit wenig eiskaltem Wasser gewaschen und i. Vak. getrocknet 166,5 g wogen. Beim Einengen der Mutterlauge bis auf 250 ccm wurden beim Erkalten weitere 25,5 g erhalten. Schmp. 126°. Ausb. 79 % d.Th.

Trennung der Diastereomeren. 50 g Formyl-isoleucin pract. löste man in 185 ccm heißem abs. Äthanol und goß in eine warme Lösung von 120 g Brucin (getrocknet bei 110°, Schmp. 178°) in 1 l abs. Äthanol ein, kühlte auf 0° und ließ über Nacht stehen. Das ausgefallene Brucinsalz des Formyl-D-allo-isoleucins wog nach dem Trocknen 78,5 g. Die Mutterlauge wurde i. Vak. bis zur Kristallisation des Sirups - Brucinsalz des Formyl-L-isoleucins - eingedampft.

Die D-Komponente (78,5 g) nahm man in 380 ccm Wasser auf, kühlte auf 0°, fügte 180 ccm eisgekühlte n NaOH zu und vergewisserte sich vor dem Absaugen des nach 15 Min. kristallisierenden Brucin-Niederschlags von der Vollständigkeit der Fällung. Das zurückgewonnene Brucin wusch man gut mit Wasser aus und trocknete bei 110°. Die Mutterlauge samt Waschwässern schüttelte man zur Entfernung restlichen Brucins je einmal mit Chloroform und Äther, stellte mit 6n HCl auf pH 5 ein, engte i. Vak. bei 40° bis auf ca 150 ccm ein und gab 30 ccm 6n HCl zu, worauf Formyl-D-allo-isoleucin auskristallisierte. Nach Stehen über Nacht im Eisschrank saugte man ab und wusch mit kaltem Wasser. Ausb. 17,5 g (70 % d.Th.). Schmp. 116-124°. $[\alpha]_D^{20}$: -28,1 ±0,4° (c 3,4 in abs. Äthanol).

Die L-Komponente des Brucinsalzes lieferte bei gleicher Behandlung 19,75 g (nach Umkristallisation aus Wasser) Formyl-L-isoleucin vom Schmp. 156-158°. Ausb. 79 % d.Th. $[\alpha]_D^{20}$: -27,6 ±0,6° (c 3,5 in abs. Äthanol).

D-Allo-isoleucin-methylester (XI). 25,3 g Formyl-D-allo-isoleucin wurden 2 Stdn. mit 270 ccm 3n HCl unter Rückfluß

gekocht und die Lösung i. Vak. eingedampft. Man dampfte noch dreimal i. Vak. mit Wasser ab und trocknete den Rückstand auf einer Tonplatte im Vakuumexsikkator über Kaliumhydroxyd und konz. Schwefelsäure. Das reine D-Allo-isoleucin-hydrochlorid (24 g) löste man in 500 ccm Methanol, leitete unter Eiskühlung bis zur Sättigung trockenes Chlorwasserstoffgas ein, erhitzte 1 Stde. unter Rückfluß zum Sieden, wobei das Gas in Strömen entwich. Anschließend destillierte man das Methanol i. Vak. ab und wiederholte die ganze Prozedur noch zweimal. Der zuletzt kristallin erstarrte Sirup wurde mit 13 ccm Wasser aufgenommen, mit 350 ccm Äther überschichtet und mit konz. wäßr. Ammoniak bis zur Rotfärbung von Phenolphthaleinpapier versetzt. Die XI enthaltende Ätherphase schüttelte man zur Entfernung von Ammoniak viermal mit je 13 ccm Wasser aus, trocknete über Natriumsulfat und rektifizierte i. Vak. Ausb. 17,43 g (75,5 % d.Th.) Sdp.$_{12}$ 74°. $(\alpha)_D^{19}$: -49,2° (c 3,37 in abs. Äthanol). Der farblose, flüssige Ester war gut verschlossen im Eisschrank 5 Monate unzersetzt haltbar.

D-Allo-isoleucin-methylester-hydrochlorid 0,77 g XI wurde in 25 ccm Äther gelöst und unter Eiskühlung trockenes Chlorwasserstoffgas eingeleitet. Man vertrieb den Äther i. Vak., digerierte den weißen krist. Rückstand mit frischem Äther und saugte ab. Ausb. 0,88 g, (91 % d.Th.) Schmp. 122°. $(\alpha)_D^{18}$: -30,4 ±0,3° (c 2,3 in Methanol).

Cbo-L-threonyl-D-allo-isoleucin-methylester (XII) a. Allgemeine Darstellung wie bei IV, S. 41. Mengenangaben je 29,4 mMol:

7,45 g Cbo-L-threonin (X) (α: -1,74°) u.
7,0 ccm Tri-n-butylamin in 20 ccm abs. Tetrahydrofuran u.
35 ccm abs. Toluol,
2,82 ccm Chlorkohlensäure-äthylester bei -15°,
nach 5 Min.: 4,32 g XI.

Nach zweimaliger Umkristallisation aus Essigester/Petroläther (1:9) erhielt man 3,5 g weißes Kristallpulver vom Schmp. 87-89°. Ausb. 31,3 % d.Th. $(\alpha)_D^{20}$: -1,6 ±0,5° (c 3,23 in Methanol).

b. Mengenangaben je 51 mMol: Zu einer Lösung von 12,9 g X in 13 ccm Methylenchlorid gab man unter Kühlung gleichzeitig 7,41 g XI und eine Lösung von 10,5 g N,N'-Dicyclohexyl-carbodiimid[24] in 20 ccm Methylenchlorid, ließ über Nacht stehen, saugte den

ausgefallenen N,N'-Dicyclohexyl-harnstoff (10,5 g) ab, verdünnte das Filtrat mit Methylenchlorid und wusch wie üblich mit n HCl, 0,4n $NaHCO_3$ und Wasser. Die nach dem Trocknen über Natriumsulfat und Abdampfen des Methylenchlorids verbliebene weiße Kristallmasse wog nach der Umkristallisation aus Essigester/Petroläther - (1:9) 15,5 g; Ausb. 80 % d.Th.
Schmp. 90-92°. $(\alpha)_D^{19}$: -2,0 ±0,5° (c 3,23 in Methanol)

L-Threonyl-D-allo-isoleucin-methylester (XIII) Abspaltung der Cbo-gruppe wie bei IX, S. 44: 12,5 g XII in 120 ccm Methanol, 0,85 g Pd/C (5 %), o h n e Salzsäure. Steifer, farbloser Sirup (8,19 g); quant. Ausb. $(\alpha)_D^{19}$: +3,6° ±0,4° (c 4,4 in Methanol)

N-(2-Nitro-3-hydroxy-4-methyl-benzoyl)-L-threonyl-D-allo-isoleucinmethylester (XV) Mengenangaben je 29,2 mMol: Bei g l e i c h z e i t i g e r Zugabe von 7,18 g XIII und 6,0 g Dicyclohexyl-carbodiimid in je 25 ccm Methylenchlorid zu einer Lösung von 5,74 g 2-Nitro-3-hydroxy-4-methyl-benzoesäure (XIV, Schmp. 186°) in 25 ccm abs. Tetrahydrofuran färbte sich die Mischung sofort tiefrot. Der über Nacht ausgefallene Dicyclohexyl-harnstoff (6,27 g) wurde abgesaugt und die Mutterlauge i. Vak. zur Trockene eingedampft. Glasig-amorphe rote Masse. Ausb. 12,98 g.

2 g des Rohprodukts löste man in Essigester, schüttelte mit 3-proz. wäßr. Natriumcarbonatlösung erschöpfend aus, säuerte die abgetrennte, wäßr. Phase mit 4n HCl an und extrahierte mit Essigester, der beim Eindampfen i. Vak. 1,92 g eines vorgereinigten, roten Lacks hinterließ. Diesen chromatographierte man an einer Säule (4,8 x 65 cm) aus neutralem, mit Chloroform eingeschlämmten Kieselgel[26] und eluierte mit Chloroform/Aceton - (4:1). Der Inhaltsstoff der gelben Hauptzone kristallisierte aus Essigester/Cyclohexan in feinen, gelben Nadeln vom Schmp. 113-115°. Ausb. 1,6 g, 80 % d.Th.
$(\alpha)_D^{22}$: -6,75 ±0,35° (c 3,16 in Methanol)

$C_{19}H_{27}O_8N_3$ (425,4): Ber. C 53,70 H 6,40 N 9,88 CH_3O 7,3
Gef. 53,67 6,53 9,83 7,3

5 Stdn. i. Hochvak. bei 70° getrocknet.

Actinocinyl-bis-(L-threonyl-D-allo-isoleucinmethylester) (XVI)
(Allgemeines Beispiel für die Reduktion der Nitrogruppe und der oxydativen Kondensation zum Phenoxazonsystem)

1,64 g XV (Rohprodukt) löste man in 50 ccm Methanol, fügte etwas

Raney-Nickel zu, evakuierte und spülte den Kolben samt Inhalt abwechselnd dreimal an der Hydrierapparatur mit Wasserstoff und hydrierte unter Schütteln bis zur Sättigung. Nun wurde schnell eine langhalsige Hydrierfritte aufgesetzt[16], die rote Lösung vom Katalysator ab- und in einen vorevakuierten Kolben hineingesaugt und i. Vak. bis auf ca 10 ccm eingeengt. Diese Menge tropfte man innerhalb von 15 Min. zu einer bei 40° gerührten Lösung von 3,8 g (6 Äquivalente) Kaliumhexacyanoferrat-III in 200 ccm m/15 Phosphatpuffer pH 7,4. Hierbei schieden sich rote Flocken ab. Man rührte weitere 2 Stdn. und extrahierte mit Chloroform, das nach dem Trocknen und Eindampfen 1,38 g eines roten Lacks hinterließ. 0,7 g davon chromatographierte man an einer Säule (3,6 x 70 cm) aus saurem, mit Chloroform eingeschlämmten Kieselgel[26] und eluierte mit Chloroform/Aceton -(1:1). Das Eluat der Hauptzone schüttelte man mit 0,4n $NaHCO_3$ durch, um evtl. dem Kieselgel entzogene Salzsäure zu binden, und fällte den nach dem Eindampfen erhaltenen Lack aus Benzol/Cyclohexan um. Rotes, amorphes Pulver, das ohne zu schmelzen ab 93° sintert. Ausb. 0,38 g, 51 % d.Th. $(\alpha)_D^{19}$: -74 ±5° (c 0,31 in Methanol); $(\alpha)_D^{20}$: +2 ±2° (c 0,28 in Essigester)

$C_{38}H_{52}O_{12}N_6$ (784,7): Ber. C 58,15 H 6,68 N 10,71 CH_3O 7,91
Gef. 57,87 6,60 10,64 7,50

5 Stdn. i. Hochvak. bei 60° getrocknet.

Actinocinyl-bis-(L-threonyl-D-allo-isoleucin) (XVIa) a. 0,7 g des ungereinigten XVI löste man in 50 ccm Isopropanol, gab 0,1 g Pd/C (5 %) zu und hydrierte bei aufgesetzter Hydrierfritte[16] bis zu einem Mindestverbrauch von 20 ccm Wasserstoff. Nun kehrte man den Kolben um und ließ durch die Fritte die vom Katalysator befreite Lösung in einen vorevakuierten, mit 50 ccm n/5 NaOH beschickten Zweihalskolben eintropfen, der mit einem 10 ccm n HCl fassenden Kölbchen über eine Brücke mit Absaugrohr in Verbindung stand. Den Reaktionskolben erwärmte man 4 Stdn. auf 40°, ließ durch Neigen der Apparatur die vorgelegte Salzsäure zufließen und e r s t a n s c h l i e ß e n d durch Öffnen eines Hahns Luft einströmen. Beim Umschütteln färbte sich die gelbe Lösung infolge Reoxydation wieder rot. Man verdampfte i. Vak. zur Trockene, verteilte den Rückstand zwischen beiden Phasen des Systems Isoamylalkohol/$\frac{m}{15}$ Phosphatpuffer pH 6,0 - (1:1), verwarf die Unterphase und chromatographierte die

rote Oberphase auf der entsprechend präparierten Cellulosesäule (Schleicher & Schüll Nr. 123) (4,8 x 60 cm). Das Eluat der Hauptzone lieferte beim Eindampfen einen roten Lack, der sich durch Lösen in 0,4n $NaHCO_3$ und Ausflocken mit n HCl von anhaftendem Isoamylalkohol befreien ließ. Ausb. 0,57 g (85 % d.Th.). Sintert ab 150° ohne zu schmelzen. $(\alpha)_D^{20}$: -69,5 ±5° (c 0,31 in Methanol).

$C_{36}H_{48}O_{12}N_6$ (756,7): Ber. C 57,2 H 6,39 N 11,10
Gef. 56,6 6,60 10,83

6 Stdn. i. Hochvak. bei 100° getrocknet.

b. 0,6 g ungereinigtes XV löste man in 5 ccm Isopropanol, verseifte 45 Min. bei 20° mit 4,25 ccm n NaOH (3 Äquivalente), neutralisierte mit 4,25 ccm n HCl, dampfte i. Vak. ein, nahm mit 40 ccm Methanol auf und dekantierte vom Natriumchlorid ab. Hydrierung der Nitrogruppe in XVb und oxydative Kupplung mit 0,93 g (4 Äquivalente) Kaliumhexacyanoferrat-III in 100 ccm m/15 Phosphatpuffer pH 7,4 wie bei XVI, S. 50. Da die Säure XVIa bei pH 7,4 als Salz vorlag, schüttelte man Verunreinigungen mit Essigester aus, säuerte an und nahm die ausgefallenen roten Flocken in 20 ccm Isoamylalkohol auf, den man zur Entfernung restlicher Säure mit Wasser extrahierte und direkt auf einer Cellulosesäule (4,8 x 59 cm) im System Isoamylalkohol/$\frac{m}{15}$ Phosphatpuffer pH 6,0 - (1:1) chromatographierte. Weitere Aufarbeitung wie unter a. Ausb. 0,27 g (50 % d.Th.) amorphes Pulver. $(\alpha)_D^{22}$: -72,8 ±5° (c 0,34 in Methanol).

c. Allgemeine Ausführung wie unter b.: 0,6 g ungereinigtes XV, verseift mit 2,15 ccm n NaOH (1,5 Äquivalente). Ausb. 0,18 g (34 % d.Th.) amorphes Pulver. $(\alpha)_D^{22}$: -68 ±5° (c 0,32 in Methanol). Der eingedampfte Essigesterauszug wog 0,17 g und enthielt XVI und einen Halbester.

d. Allgemeine Ausführung wie unter b.: 0,85 g (2 mMol) reines, kristl. XV in 8 ccm Isopropanol 105 Min. mit 4 ccm n NaOH (2 Äquivalente) verseift. 200 ccm m/15 Phosphatpuffer pH 7,4; 2 g Kaliumhexacyanoferrat-III (6 Äquivalente). Trennung an einer Cellulosesäule (4,8 x 57 cm) im System Isoamylalkohol/m/15 Phosphatpuffer pH 6,6. Laufzeit 40 Stdn. Ausb. 0,48 g (64 % d.Th.) feine rote Nadeln aus wäßr. Methanol. Schmp. 222° (Zers.) $(\alpha)_D^{21}$: -72,2 ±3° (c 0,35 in Methanol).

$C_{36}H_{48}O_{12}N_6$ (756,7): Ber. C 57,20 H 6,39 N 11,10
Gef. 57,36 6,60 11,08

6 Stdn. i. Hochvak. bei 130° getrocknet.

L-Prolin-methylester 9 g L-Prolin-methylester-hydrochlorid (III), das durch angezogenes Wasser zu einem Sirup zerlaufen war, wurde in 10 ccm Wasser gelöst, mit 250 ccm Äther überschichtet und unter Eiskühlung mit konz. wäßr. Ammoniak bis zur Rotfärbung von Phenolphthaleinpapier versetzt. Man schüttelte kräftig durch, wusch den abgetrennten Äther viermal mit je 8 ccm Wasser, trocknete, vertrieb den Äther i. Vak. und rektifizierte den freien Ester. Ausb. 1,4 g farblose Flüssigkeit vom $Sdp._{13}$ 73,5°, die gut verschlossen im Kühlschrank 1 Woche unzersetzt haltbar war.

Actinocinyl-bis-(L-threonyl-D-allo-isoleucyl-L-prolinmethylester) (XVII)

Zu einer Lösung von 185 mg XVIa (0,245 mMol) in 6 ccm abs. Tetrahydrofuran schüttete man gleichzeitig 103 mg (0,5 mMol) Dicyclohexyl-carbodiimid und ca 130 mg (1 mMol) L-Prolinmethylester in je 6 ccm abs. Methylenchlorid zu, saugte nach Stehen über Nacht den ausgefallenen Dicyclohexyl-harnstoff ab, verdünnte das Filtrat mit Methylenchlorid und wusch mit n HCl, 0,4 n $NaHCO_3$ und Wasser. Aus dem tiefroten Natriumhydrogencarbonat-Extrakt erhielt man durch Ansäuern 52 mg unreines Ausgangsprodukt zurück.

Die organische Phase lieferte 136 mg eines roten Lacks, der sich an einer Säule aus neutralem, mit Chloroform eingeschlämmten Kieselgel beim Eluieren mit Chloroform/Aceton in 2 Zonen auftrennte. Der Inhaltsstoff der s c h n e l l e r e n Zone (77 mg) ließ sich aus Essigester/Cyclohexan in roten Flocken umfällen (37 mg), die ab 131° sinterten ohne zu schmelzen und in 0,4n $NaHCO_3$ unlöslich waren. $(\alpha)_D^{20}$: -178 ±15° (c 0,3 in Methanol).

Das Präparat lief auf dem Papierchromatogramm einheitlich in den Systemen tert. Amylalkohol/n-Dibutyläther/10-proz. wäßr. Natrium-m-kresotinat - (1:2:3) und n-Butanol/n-Dibutyläther/10-proz. wäßr. Natrium-m-kresotinat- (2:3:5).

$C_{48}H_{66}O_{14}N_8$ (XVII, 979): Ber. CH_3O 6,34 Gef. CH_3O 5,7
Quant. Aminosäurebestimmung. Gef.(Mol) Thr 1,79 Aileu 2,16 Pro 2,22.

Der Inhaltsstoff der l a n g s a m e r e n Zone (Mono-L-prolinmethylester, XVIIa, 33 mg) wurde aus heißem Benzol mit

Cyclohexan in Form roter Flocken ausgefällt (24 mg), die ab 116° sinterten ohne zu schmelzen und mit 0,4n $NaHCO_3$ aus einer Lösung in Methylenchlorid ausgeschüttelt werden konnten.
$(\alpha)_D^{24}$: -95 ±6° (c 0,34 in Methanol)
$C_{42}H_{57}O_{13}N_7$ (XVIIa, 867,9): Ber. CH_3O 3,57 Gef. CH_3O 3,4
Quant.Aminosäurebestimmung: Gef.(Mol) Thr 1,42 Aileu 1,83 Pro 1,01.
XVII und XVIIa wurden 3 Stdn. i. Hochvak. bei 65° getrocknet.

N-(2-Nitro-3-hydroxy-4-methyl-benzoyl)-L-threonyl-D-allo-isoleucyl-L-prolinmethylester (XVIII) 109 mg (0,256 mMol) krist. XV wurden in 1 ccm Methanol mit 0,51 ccm n NaOH 45 Min. verseift, mit 0,51 ccm n HCl (je 2 Äquivalente) neutralisiert und die Lösung i. Vak. eingedampft. Man nahm in 5 ccm Methylenchlorid auf - ungelöstes Natriumchlorid störte nicht - und gab 80 mg 0,388 mMol) Dicyclohexyl-carbodiimid und 60 mg (0,464 mMol) L-Prolinmethylester in je 4 ccm Methylenchlorid zu. Hierbei trat keine Rotfärbung auf. Nach 20 Stdn. saugte man den Dicyclohexylharnstoff ab, wusch mit n HCl und Wasser, trocknete und verdampfte i. Vak. Den Rückstand chromatographierte man in Chloroform an neutralem Kieselgel und eluierte mit Chloroform/Aceton 2 Zonen. Den Inhaltsstoff der schnelleren Hauptzone (116 mg) fällte man aus Essigester/Cyclohexan als amorphes, gelbes Pulver. Ausb. 86 % d.Th. Sinterungsbeginn 63°. Die Totalhydrolyse zeigte Prolin an.
$C_{24}H_{34}O_9N_4$ (522,5): Ber. CH_3O 5,94 Gef. CH_3O 5,7
5 Stdn. i. Hochvak. bei 50° getrocknet.

Actinocinyl-bis-(L-threonyl-D-allo-isoleucyl-L-prolin) (XVIIc)
363 mg XVIII wurde wie üblich in 4 ccm Isopropanol (oder Methanol) 45 Min. mit 1,39 ccm n NaOH verseift, mit 1,39 ccm n HCl neutralisiert und im Vak. eingedampft. Man hydrierte in 30 ccm Methanol mit Raney-Nickel und oxydierte mit 1,37 mg Kaliumhexacyanoferrat-III in 100 ccm Phosphatpuffer pH 7,4. Nach dem Ausschütteln mit Essigester säuerte man die wäßr. Phase an, saugte die ausgefallenen roten Flocken ab (200 mg), trennte an einer Cellulosesäule (3 x 50 cm) im System Isoamylalkohol/[illegible] Phosphatpuffer pH 6,3 - (1:1) und fällte schließlich aus Benzol/Cyclohexan/Petroläther um. Ausb. 123 mg (37 % d.Th.) roten, amorphes Pulver, das ab 165° ohne zu schmelzen sinterte.
$(\alpha)_D^{20}$: -100 ±5° (c 0,36 in Methanol)

$C_{46}H_{62}O_{14}N_8$ (951): Ber. C 58,20 H 6,58 N 11,79
Gef. 57,80 6,50 11,79

Quant.Aminosäurebestimmung: Gef.(Mol):
Thr 1,88 Aileu 1,93 Pro 2,03

4 Stdn. i. Hochvak. bei 100° getrocknet.

L-Prolinbenzylester-hydrochlorid 5 g L-Prolin suspendierte man in 70 ccm dest. Benzylalkohol, leitete bis zur Sättigung trockenes Chlorwasserstoffgas ein, gab 50 ccm Benzol zu und destillierte das Wasser i. Vak. bei 70° Wasserbadtemperatur azeotrop ab. Diesen Vorgang wiederholte man noch dreimal, ohne den Benzylalkohol zu erneuern. Nebenbei bildete sich auch etwas Benzylchlorid (Geruch!) und deshalb auch immer wieder Wasser. Schließlich destillierte man das Lösungsmittel i. Vak. bei 3,5 Torr und 130° Ölbadtemperatur ab. Den zurückbleibenden Sirup verdünnte man mit 25 ccm Methanol und fällte mit Äther gelbe Kristalle aus. Die gelbe Verunreinigung ließ sich der wäßr. Lösung des Ester-hydrochlorids durch Extraktion mit Chloroform entziehen.

Ausb. 9,5 g weiße Prismen (90 % d.Th.) vom Schmp. 136-140°.
$(\alpha)_D^{21}$: -46,8 ±0,5° (c 3,4 in 5n HCl) bez. auf den freien Ester.
Produkte mit stärkerer Linksdrehung enthalten mehr Prolin.

$C_{12}H_{16}O_2NCl$ (241,7): Ber. C 59,70 H 6,67 N 5,80 Cl 14,68
Gef. 59,70 6,75 6,18 14,70

Prolin-hydrochlorid:
$C_5H_{10}O_2NCl$ (151,58) Ber. 39,60 6,65 9,25 23,40

Prolin kann daher nur in geringsten Spuren vorhanden sein, was durch ein Aminosäurechromatogramm bestätigt wurde.

Actinocinyl-bis-(L-threonyl-D-allo-isoleucyl-L-prolinbenzylester) (XVIIb). Schnellverfahren a. Allgemeine Durchführung wie bei XVIa, Ansatz b, S. 52. 2 g XV (Rohprodukt) in 18 ccm Isopropanol, 9,4 ccm n NaOH. Verseifungsdauer: 2 Stdn. 9,4 ccm n HCl (2 Äquivalente). Hydrierung mit Raney-Nickel in 60 ccm Methanol, Oxydation mit 4,65 g Kaliumhexacyanoferrat-III (6 Äquivalente) in 250 ccm Phosphatpuffer pH 6,0. Die mit Essigester ausgeschüttelte wäßr. Lösung wurde mit konz. Salzsäure angesäuert, die ausgefallenen roten Flocken in Isoamylalkohol aufgenommen und diesem durch Extraktion mit 0,4n $NaHCO_3$ wieder entzogen. Die nach erneutem Ansäuern abgesonderten Flocken wurden abgesaugt, mit Wasser gewaschen und über Phosphorpentoxyd i. Vak. getrocknet. Ausb. 1,4 g (1,85 mMol, 79 % d.Th.)

Das amorphe, papierchromatographisch ziemlich reine Präparat (XVIa) löste man in 30 ccm abs. Tetrahydrofuran und gab 987 mg (4,1 mMol) L-Prolinbenzylester-hydrochlorid und 0,565 ccm Triäthylamin in 15 ccm Methylenchlorid und 835 mg (4,05 mMol) Dicyclohexyl-carbodiimid in 10 ccm Methylenchlorid gleichzeitig zu. Nach der üblichen Aufarbeitung (vgl. XVII, S. 53) fielen 2 g papierchromatographisch fast reines XVIIb an. Bezogen auf 2-Nitro-3-hydroxy-4-methyl-benzoesäure (XIV) betrug die Gesamtausbeute 79 % d.Th.

Für analytische Untersuchungen wurde ein Teil an neutralem Kieselgel gereinigt. Das amorphe Präparat begann bei 100° zu sintern.

$(\alpha)_D^{23}$: -67 ±5° (c 0,51 in Essigester)

$C_{60}H_{74}O_{14}N_8$ (1131,2) Ber. C 63,70 H 6,60 N 9,91
Gef. 64,06 6,74 9,82

Quant.Aminosäurebestimmung: Gef.(Mol)
Thr 1,29 Aileu 1,69 Pro 1,84

3 Stdn. i. Hochvak. bei 60° getrocknet.

Schnellverfahren b. Allgemeine Durchführung wie bei XVIII, S. 54. 710 mg (1,67 mMol) reines XV in 7 ccm Isopropanol, 3,34 ccm n NaOH, Verseifungsdauer: 1 Stde. 3,34 ccm n HCl (2 Äquivalente). Die Säure XVb reagierte mit (je 1,83 mMol):

378 mg Dicyclohexyl-carbodiimid in 5 ccm Methylenchlorid,
443 mg L-Prolinbenzylester-hydrochlorid und
0,225 ccm Triäthylamin in 5 ccm Methylenchlorid

Ausb. 1,0 g (100 % d.Th.) papierchromatographisch reines XVIIIa.

1,0 g XVIIIa löste man in 40 ccm Methanol und hydrierte mit Raney-Nickel bis 122,1 ccm Wasserstoff (22°, 751 Torr; ber. 122,5 ccm) verbraucht waren. Oxydation mit 1,65 g Kaliumhexacyanoferrat-III in 300 ccm m/15 Phosphatpuffer pH 7,4. Die kolloidale Mischung extrahierte man mit Methylenchlorid, wusch mehrmals mit 0,4n $NaHCO_3$ und verdampfte die organische Phase i. Vak. Ausb. 821 mg papierchromatographisch reines Präparat (87 % d.Th., bez. auf XV). An neutralem Kieselgel wurde ein kleiner Teil gereinigt.

$(\alpha)_D^{23}$: -70° ±5° (c 0,48 in Essigester)

$C_{60}H_{74}O_{14}N_8$ (XVIIb, 1131,2) Ber. C 63,70 H 6,60 N 9,91
Gef. 63,50 6,65 10,11

3 Stdn. i. Hochvak. bei 60° getrocknet.

(Zu Abschnitt D)

Actinocinyl-bis-(L-threonyl-(O-acetyl)-D-allo-isoleucyl-L-prolin-benzylester)

27 mg XVIIb löste man in 0,5 ccm abs. Pyridin und 4,5 ccm Acetanhydrid. Nach Stehen über Nacht dampfte man i. Vak. ab, nahm in Chloroform auf und wusch mit n HCl, 0,4n $NaHCO_3$ und Wasser. Die organische Phase wurde mit Natriumsulfat getrocknet, über eine Säule (2 x 20 cm) aus neutralem, mit Chloroform eingeschlämmten Kieselgel filtriert und mit Chloroform/Aceton eluiert, um anhaftendes Acetanhydrid und eine kleine Nachzone abzutrennen. Zur Analyse fällte man den beim Eindampfen erhaltenen Lack aus Benzol/Petroläther um. Das amorphe Präparat sinterte ab 110° ohne zu schmelzen. Ausb. 29 mg (100 % d.Th.)

$C_{64}H_{78}O_{16}N_8$ (1215,3): Ber. CH_3CO 7,08 Gef. CH_3CO 6,80+)

3 Stdn. i. Hochvak. bei 70° getrocknet.

+) Nach Abzug eines Blindwerts von 1,0 %.

N-Cbo-N-methyl-L-valin

1. N-Formyl-DL-valin aus DL-Valin[19], weiße Prismen, Schmp. 142°. Ausb. 74 % d.Th. (vgl. Formyl-isoleucin pract. S. 48)
2. Trennung der Antipoden[20]: N-Formyl-D-valin+), Schmp. 150-151°, Ausb. 54 % d.Th. $(\alpha)_D^{20}$: -12,5 ±0,2° (c 7,8 in abs. Äthanol) N-Formyl-L-valin+), Schmp. 150-151°, Ausb. 46 % d.Th. $(\alpha)_D^{20}$: +11,8 ±0,2° (c 8,0 in abs. Äthanol). (vgl. die Brucinspaltung S. 48!)
3. L-Valin-hydrochlorid[20]: vgl. D-Allo-isoleucin-hydrochlorid, Ausb. 100 % d.Th. S. 49!
4. N-Tosyl-L-valin[29,30] 10,75 g (70 mMol) L-Valin-hydrochlorid nahm man in wenig Wasser auf, gab 150 ccm n NaOH zu, filtrierte und versetzte mit einer Lösung von 26,7 g (140 mMol) p-Toluolsulfochlorid in 130 ccm Äther. Bei 10-20° rührte man das Zweiphasengemisch 6 Stdn. kräftig mit einem Vibromischer und fügte nach 1, 2 u. 3 Stdn. jeweils 34 ccm 2n NaOH zu. Die wäßr. Phase wurde noch zweimal mit frischem Äther zur Entfernung des restlichen Tosylchlorids ausgeschüttelt, mit rauch. Salz-

+) Um keine Verwechslungen aufkommen zu lassen, ist es wissenswert, daß E. Fischer (20) das in Methanol gelöste N-Formyl-L-valin-Brucinsalz als d- und das ausgefallene N-Formyl-D-valin-Brucinsalz als l-Antipoden bezeichnete.

säure (ca 9 ccm) angesäuert und die ausgefallene Kristallmasse nach mehrstündigem Stehen im Kühlschrank abgesaugt. Man kristallisierte aus wäßr. Methanol um.
Ausb. 17,1 g (90 % d.Th.). Schmp. 148-150°.

5. N-Tosyl-N-methyl-L-valin. 17 g (62,7 mMol) N-Tosyl-L-valin löste man in 125 ccm 2n NaOH, gab 28 g Methyljodid zu und rührte kräftig 6 Stdn. unter Rückfluß in einem Wasserbad von 66° (Kontaktthermometer). Nach 3 Stdn. fügte man weitere 5 ccm Methyljodid zu. Man ließ die Mischung erkalten, extrahierte überschüssiges Methyljodid zweimal mit Äther und säuerte mit konz. Salzsäure an. Das ausgeschiedene, braune Öl nahm man in Äther auf, schüttelte mit Natriumhydrogensulfit-Lösung bis zur Farblosigkeit, wusch mit 2n HCl und Wasser, trocknete und vertrieb den Äther i. Vak. Der sirupöse Rückstand kristallisierte über Nacht im Kühlschrank. Ausb. 12,87 g (72 % d.Th.)

6. N-Methyl-L-valin[31] Ca 250 ccm trockenen Ammoniak kondensierte man in einen 500 ccm Zweihalskolben mit Anschütz-Aufsatz ein. Die Kühlung besorgte ein Methanol/Trockeneis-Bad. Unter kräftigem Rühren beschickte man die Flüssigkeit mit 12,1 g N-Tosyl-N-methyl-L-valin und nach und nach mit kleinen Stücken Natrium, bis die Farbe beständig schwarzblau war. Man rührte noch 2 Stdn. weiter und zerstörte überschüssiges Natrium mit wenig Ammonchlorid, wobei die Farbe in gelbgrün umschlug. Über Nacht verdunstete der Ammoniak, den Rückstand nahm man in wenig Wasser auf, säuerte mit konz. Salzsäure vorsichtig an, extrahierte das entstandene Thiophenol dreimal mit Äther und dampfte die wäßr., durch kolloidalen Schwefel getrübte Lösung i. Vak. ein. Der Rückstand wurde in 150 ccm warmem, abs. Äthanol gelöst, vom unlöslichen Natrium- und Ammonchlorid abfiltriert, i. Vak. zur Trockene eingedampft und nochmals, nun aber unter strengem Ausschluß von Feuchtigkeit mit abs. Äthanol ausgezogen. Die durch eine Fritte filtrierte Lösung engte man auf 50 ccm ein und gab Triäthylamin bis zur schwach alkalischen Reaktion zu, wobei N-Methyl-valin ausfiel. Man saugte ab und wusch mit eiskaltem abs. Äthanol bis im Filtrat keine Chlorionen mehr nachzuweisen waren.

Ausb. 4,75 g weißes Kristallpulver (86 % d.Th.). Das Präparat enthielt Valin in Spuren (Papierchromatogramm im System: n-Butanol/Wasser/Eisessig/Phenol - (40:40:5:18).

$(\delta)_D^{20}$: +17,43 ±0,2° (c 4,7 in Wasser)
$(\alpha)_D^{20}$: +30,6 ±0,3° (c 4,23 in 5n HCl) [32]

7. N-Cbo-N-methyl-L-valin. 3,28 g N-Methyl-L-valin wurden in 12,5 ccm 2n NaOH gelöst und unter Eiskühlung und Rühren mit dem Vibromischer ca 1/3 von 4,25 g Cbo-chlorid zugefügt. Als nach 2 Stdn. die Lösung wieder klar und der pH-Wert von ca 11 auf ca 10 gesunken war, wurden 4 ccm 2n NaOH und ein weiteres Drittel Cbo-chlorid zugeschüttet. Zu dem kristallinen Brei des ausgeschiedenen Natriumsalzes gab man allmählich weitere 8,5 ccm 2n NaOH und den Rest des Cbo-chlorids. Nach insgesamt 5 Stdn. verdünnte man mit Wasser, entfernte überschüssiges Cbo-chlorid mit Äther, säuerte mit konz. Salzsäure an, nahm das Öl in Äther auf, trocknete und vertrieb den Äther i. Vak. Der farblose Rückstand kristallisierte nach einigen Stdn. im Vakuumexsikkator. Eine Umkristallisation war nicht möglich. Ausb. 4,3 g (66,4 % d.Th.).

Das auf gleiche Weise erhaltene N-Cbo-N-methyl-DL-valin fiel in 80 proz. Ausb. an und kristallisierte nach 2 Wochen.

Versuch zur Kupplung von Actinocinyl-bis-(L-threonyl-D-allo-isoleucin) (XVIa) mit N-Cbo-N-methyl-DL-valin. Phosgenmethode[27].

Zu einer im Dewar-Gefäß auf -70° gekühlten Lösung von 1,6 g Cbo-methylvalin (5,9 mMol) und 1,54 ccm Tri-n-butylamin (6,5 mMol) in 20 ccm abs. Tetrahydrofuran wurden 2,48 ccm (6 mMol) Phosgen/Toluol-Lösung (2,42 mMol Phosgen/ccm Toluol) zugetropft und der Kolben gut verschlossen. Nach 20 Min. goß man eine -40° kalte Lösung von 0,68 g XVIa (0,9 mMol) in 20 ccm abs. Pyridin zu, durchmischte mit einem Glasstab und ließ über Nacht im Eisschrank stehen. Bei 45° dampfte man i. Vak. ein, nahm den roten Sirup in Chloroform auf, wusch zweimal mit 2n HCl und Wasser, trocknete und destillierte das Lösungsmittel i. Vak. ab. Der ölige Rückstand wurde in 20 ccm Pyridin gelöst und nochmals der gleichen Reaktion unterworfen: 1,1 g Cbo-methylvalin, 1,14 ccm Tri-n-butylamin, 20 ccm Tetrahydrofuran, 1,74 ccm Phosgen/Toluol-Lösung (je 4,2 mMol).

Den vorgereinigten Sirup löste man in 50 ccm Methanol, gab Palladium-Kohle (5 %) zu und spaltete die Cbo-gruppe hydrogenolytisch ab. Nach Absaugen des Katalysators und des ausgefallenen, überschüssigen Methylvalins hinterblieb ein Öl, welches sich durch Umfällen mit Methylenchlorid/Cyclohexan in einen pulvrigen

(400 mg) und einen öligen (268 mg) Anteil zerlegen ließ[+]. Da die Totalhydrolyse nur im Öl Methylvalin anzeigte, wurde es mehrfach an neutralem Kieselgel aufgetrennt: Zone 1 (Front) 74 mg Öl; 2. 34 mg Öl; 3. 23 mg Lack; 4. 19 mg Lack; 5. Rückstand 65 mg Lack. Einzig Zone 3 enthielt alle 3 Aminosäuren, aber der Chromophor war nicht mehr intakt. (vgl. auch S. 35!)

Versuch zur Kupplung von Actinocinyl-bis-(L-threonyl-D-alloisoleucyl-L-prolinbenzylester) (XVIIb) mit N-Cbo-N-methyl-DL-valin. Phosgenmethode (27).

Der Umsatz geschah wie oben in kleinerem Maßstab: 133 mg (0,5 mMol) Cbo-methylvalin u. 0,07 ccm Triäthylamin in 2 ccm abs. Tetrahydrofuran; 0,25 ccm (0,5 mMol) Phosgen/Toluol-Lösung (2,08 mMol Phosgen/ccm Toluol); 33,9 mg XVIIb (0,03 mMol) in 2 ccm abs. Pyridin. Der in Essigester aufgenommene Rückstand wurde diesmal auch mit 0,4n $NaHCO_3$ gewaschen und anschließend in Methanol mit Pd/C (5 %) hydriert. Das Pherogramm[++] zeigte eine ca 10-proz. einseitige Anlagerung an. Vgl. S. 35!

Kupplung mit N,N'-Carbonyl-diimidazol[33,34]

a. 40 mg Cbo-methylvalin, 25 mg N,N'-Carbonyl-diimidazol und 5,7 mg (5×10^{-3} mMol) XVIIb wurden in 5 ccm abs. Methylenchlorid gelöst und 10 Min. im Wasserbad von 40° erwärmt. Das Papierchromatogramm zeigte nur unverändertes XVIIb an.

b. 16,2 mg Carbonyl-diimidazol wurde in 4 ccm abs. Tetrahydrofuran gelöst mit 16,7 mg Methylvalin-hydrochlorid geschüttelt und 5 Min. bei aufgesetztem Chlorcalciumrohr auf 40° erwärmt. Nach Zugabe von 5,7 mg XVIIb in 4 ccm Tetrahydrofuran erhitzte man nochmals 5 Min. Ein Pherogramm zeigte die gewünschte Anlagerung nicht an. Vgl. S. 36!

Kupplung nach Schotten-Baumann

a. 44 mg Cbo-methylvalyl-chlorid[9], 5,7 mg XVIIb und 0,4 ccm (2 Äquivalente) Pyridinlösung (0,2 % Pyridin in abs. Methylenchlorid) wurden in 5 ccm abs. Methylenchlorid vereinigt und über Nacht stehen gelassen. Derselbe Ansatz wurde mit 4 ccm Pyridinlösung wiederholt. Ein Pherogramm zeigte keine Anlagerung an. Vgl. S. 37!

+) Eine ausführliche Beschreibung des langwierigen Trennungsgangs würde zu weit führen.

++) Pherograph-Original-Frankfurt DBGM; Puffer pH 1,1: 150 ccm konz. Ameisensäure, 100 ccm Eisessig, 750 ccm Wasser.

b. 2,8 mg (5×10^{-3} mMol) Actinocinyl-bis-L-threoninmethylester, 0,4 ccm Pyridinlösung und 18,6 mg Methylvalylchlorid-hydrochlorid[36] löste man in 5 ccm abs. Methylenchlorid, ließ 24 Stdn. stehen, dampfte i. Vak. ein und nahm mit 0,5 ccm Methanol auf. Ein Pherogramm zeigte eine ca 50-proz. einseitige Anlagerung an.

c. 4,5 mg ($5,7 \times 10^{-3}$ mMol) Actinocinyl-bis(L-threonyl-D-allo-isoleucinmethylester) (XVI), 0,45 ccm Pyridinlösung, 25 mg Methylvalylchlorid-hydrochlorid, 5 ccm abs. Methylenchlorid. Reaktionsdauer 48 Stdn. Ein Pherogramm zeigte eine ca 20-proz. einseitige Anlagerung an.

d. 13 mg ($1,15 \times 10^{-2}$ mMol) XVIIb, 1 ccm Pyridinlösung, 40 mg Methylvalylchlorid-hydrochlorid, 5 ccm abs. Methylenchlorid. Reaktionsdauer 30 Stdn. Ein Pherogramm zeigte keine Anlagerung an. Zu b-d vgl. S. 38.

e. 10 mg ($2,1 \times 10^{-2}$ mMol) N-(2-Nitro-3-benzyloxy-4-methyl-benzoyl)-L-threonin-benzylester, 36 mg Methylvalylchlorid-hydrochlorid, 0,9 ccm Pyridinlösung, 5 ccm abs. Methylenchlorid. Reaktionsdauer 26 Stdn. Die Lösung wurde mit Wasser gewaschen und eingedampft. Ein Pherogramm zeigte eine spurenweise, unter der UV-Lampe sichtbare Anlagerung an. Unter zeitweiliger Erwärmung mit dem Föhn hydrierte man 3 Stdn. mit Raney-Nickel und nach Absaugen des Katalysators noch 6 Stdn. mit Platin. Die oxydative Kupplung erfolgte mit 20 mg Kaliumhexacyanoferrat-III in 50 ccm m/15 Phosphatpuffer pH 7,4. Nach dem Ansäuern extrahierte man mit n-Butanol. Ein Pherogramm zeigte eine spurenweise, einseitige Anlagerung an. Vgl. S. 39!

Literaturverzeichnis

1 H. Brockmann, Angew. Chem. 66, 1 (1954).

2 H. Brockmann u. H. Muxfeldt, Angew. Chem. 68, 69 (1956).

3 H. Brockmann u. H. Muxfeldt, Chem. Ber. 91, 1242 (1958).

4 H. Brockmann, G. Bohnsack, B. Franck, H. Gröne, H. Muxfeldt u. C. Süling, Angew. Chem. 68, 70 (1956)

5 H. Brockmann u. P. Boldt, Naturwissenschaften 46, 262 (1959).

6 R. Schwyzer, P. Sieber u. K. Zatsko, Helv. chim. Acta 41, 491 (1958).

7 A.C. Farthing, J. chem. Soc. (London) 1950, 3213.

8 J.R. Vaughan, Jr. u. R.L. Osato, J. Amer. chem. Soc. 74, 676 (1952).

9 M. Bergmann u. L. Zervas, Ber. dtsch. chem. Ges. 65, 1196 (1932).

10 M. Brenner u. W. Huber, Helv. chim. Acta 36, 1113 (1953).

11 D. Ben Ishai u. A. Berger, J. org. Chemistry 17, 1564 (1952).

12 W. Grassmann u. E. Wünsch, Chem. Ber. 91, 462 (1958).

13 T. Astrup, A. Stage u. E. Olsen, Acta chem. scand. 5, 1343 (1951).

14 W. Sunderkötter, Diplomarbeit Göttingen 1956, Dissertation 1958.

15 W. Otting, Chem.-Ing.-Technik 24, 452 (1952). Berechnungstabellen hierzu: E. Abderhalden, Handbuch d. biol. Arbeitsmethoden, Abt. I, Teil 7, 263 (1923).

16 G. Troemel, Diplomarbeit Göttingen 1959.

17 D. Berndt, Diplomarbeit Göttingen 1958.

18 G. Riley, J.H. Turnbull u. W. Wilson, J. chem. Soc. (London) 1957, 1375.

19 M.A. Nyman u. R.M. Herbst, J. org. Chemistry 15, 114 (1950).

20 E. Fischer, Ber. dtsch. chem. Ges. 39, 2322 (1906).

21 U. Bahr, unveröffentlicher Arbeitsbericht, Göttingen Dez. 1957.

22 J.R. Vaughan, Jr., J. Amer. chem. Soc. 74, 6137 (1952).
J.R. Vaughan, Jr. u. J.A. Eichler, ebenda 75, 5556 (1953).

23 J.C. Sheehan u. G.P. Hess, J. Amer. chem. Soc. 77, 1067 (1955).
J.C. Sheehan, M. Goodman u. G.P. Hess, ebenda 78, 1367 (1956).

24 G. Amiard u. R. Heymès, Bull. Soc. chim. France 5, 1360 (1956).

25 M. Pestemer, Angew. Chem. 63, 118 (1951).

26 H. Brockmann u. W. Müller, Chem. Ber. 91, 1929 (1958)

27 M. Brenner, J.P. Zimmermann, P. Quitt, W. Schneider u. A. Hartmann, Helv. chim. Acta 40, 604 (1957).

28 R. Mecke, unveröffentlichter Arbeitsbericht, Göttingen 1958.

29 A.H. Cook, S.F. Cox u. T.H. Farmer, J. chem. Soc. (London) 1949, 1026.

30 E. Fischer u. W. Lipschitz, Ber. dtsch. chem. Ges. 48, 360 (1915).

31 V. du Vigneaud u. O.K. Behrens, J. biol. Chemistry 117, 33 (1937).

32 Pl.A. Plattner u. U. Nager, Helv. chim. Acta 31, 2192 (1948).

33 H.A. Staab, Angew. Chem. 71, 194 (1959).

34 H.A. Staab, Liebigs Ann. Chem. 609, 75 (1957).

35 L. Velluz, G. Amiard u. R. Heymès, Bull. Soc. chim. France 5, 1283 (1955).

36 S. Levine, J. Amer. chem. Soc., 76, 1382 (1954).

Lebenslauf

Als Sohn des Diplomingenieurs Rudolf von Grunelius und seiner Ehefrau Maria de los Dolores geb. Caballero wurde ich, Sigmund von Grunelius, am 14. Juni 1933 in Frankfurt am Main geboren.

Die Volksschule besuchte ich 1939 in Berlin und von 1940-42 in Tutzing/Obb. 1943 gehörte ich der 1. Klasse des Humanistischen Gymnasiums in München-Pasing an; nach dessen Schließung gegen Kriegsende hatte ich Privatstunden bis ich im November 1945 in die 3. Klasse des Humanistischen Gymnasiums mit Internat der Benediktinerabtei Ettal/Obb. aufgenommen wurde. Dort erhielt ich nach der 8. Klasse im Juli 1951 das Reifezeugnis.

Vom WS 1951/52 bis SS 1957 studierte ich 12 Semester Chemie an der Georg-August-Universität in Göttingen, wo ich im Juli 1954 das Diplom-Vorexamen bestand. Seit dem SS 1956 gehöre ich dem Arbeitskreis von Herrn Professor Dr. H. Brockmann an. Meine Diplomarbeit mit dem Thema "Sterische Momente bei Sauerstoff-Wasserstoff Brückenbindungen" schloß ich im Juli 1957 mit dem Diplom-Hauptexamen ab. Als Wahlprüfungsfach hatte ich Mikrobiologie gewählt.

Von Oktober 1957 bis Juli 1959 war ich als Doktorand bei Herrn Professor Dr. H. Brockmann an der Synthese des Actinomycins C_3 beteiligt.

Meine akademischen Lehrer waren die Herren Professoren:
Dr. H.Brockmann, Dr. O.Glemser, Dr. A.Schneider, Dr. J.Goubeau, Dr. G.O.Schenck, Dr. A.Rippel-Baldes, Dr. H.G.Schlegel, Dr. E.Wicke, Dr. W.Jost, Dr. R.W.Pohl, Dr.H.Kopfermann, Dr. E.Graeser, Priv.-Doz. Dr. H.Musso, Priv.-Doz. Dr. B.Franck, Priv.-Doz. Dr. N.Pfennig, Doz. Dr. Jagodzinski.